

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Patología Animal I
(Sanidad Animal)



RESPUESTA INMUNITARIA DE ALGUNAS RAZAS
OVINAS ESPAÑOLAS A HAEMONCHUS CONTORTUS :
PURIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN ANTÍGENO
DIAGNÓSTICO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Teresa Gómez Muñoz

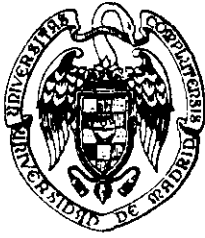
Bajo la dirección de los doctores

José María Alunda Rodríguez
Montserrat Cuquerella Ayensa

Madrid, 2002

RESPUESTA INMUNITARIA DE ALGUNAS RAZAS OVINAS ESPAÑOLAS A
HAEMONCHUS CONTORTUS. PURIFICACION Y EVALUACION DE UN
ANTIGENO DIAGNOSTICO.

María Teresa Gómez Muñoz
Licenciada en Veterinaria



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

José María Alunda Rodríguez, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Parasitología y Enfermedades Parasitarias y **Montserrat Cuquerella Ayensa**, Doctora en Veterinaria y Profesor Asociado, pertenecientes al Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de Madrid,

CERTIFICAN: que la memoria presentada por la Licenciada en Veterinaria, **Dña. María Teresa Gómez Muñoz**, titulada:

'Respuesta inmunitaria de algunas razas ovinas a Haemonchus contortus. Purificación y evaluación de un antígeno diagnóstico'

para optar al Grado de Doctor en Veterinaria ha sido realizada bajo nuestra dirección en las instalaciones de Parasitología y Enfermedades Parasitarias del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

El trabajo presentado contiene información de interés sobre la respuesta de distintas razas ovinas españolas a las infestaciones por el helminto y la purificación y evaluación de un antígeno con capacidad diagnóstica de la hemoncosis ovina y cumple, a nuestro entender, los requisitos exigibles para optar a dicho Grado.

Lo que firmamos en Madrid a dieciseis de Octubre de mil novecientos noventa y seis.

A mi familia y a Emi

A Lucía

Quiero mencionar a D. Luis Antonio Gómez Iglesias, veterinario de la Junta de Castilla y León, y agradecer su colaboración de indudable valor en muchas de las pruebas realizadas.

A Fran y Susana, compañeros a los que siempre confié mis alegrías y entusiasmos tanto como mis decepciones, y de los que he recibido una importante amistad.

Quiero agradecer a la Prof. Dña. Concepción de la Fuente de forma especial sus conocimientos en diversas áreas, que, sin duda, han resultado de gran utilidad en esta tesis. No olvido el cariño y confianza que me ha demostrado en todo momento.

Tampoco olvido la colaboración de Anabel y Jesus del Laboratorio de Proteínas del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (C.B.M.) en la secuenciación de los péptidos de interés.

Aunque ha sido mucha la colaboración que he recibido para finalizar este trabajo, la más importante la citaré a continuación:

A Emi por el gran soporte material prestado, pero especialmente por su apoyo incondicional; en definitiva, por todo.

A la Prof. Dña. Montserrat Cuquerella por su amistad, su dirección y apoyo y sus numerosos consejos. Le agradezco el haber empezado un trabajo apasionante al que, tras ella, he dedicado mucho tiempo y esfuerzo.

Hay una persona a la que debo profesionalmente todo: el Profesor D. José María Alunda; sin él este trabajo no hubiera sido posible. Siempre contará con mi respeto, mi amistad y mi reconocimiento.

Por último, quiero agradecer a la Universidad Complutense de Madrid el haberme concedido una beca predoctoral, sin la que esta Tesis no hubiera sido igual. Me gustaría agradecer, asimismo, el soporte financiero recibido por los proyectos GAN 89/324 y AGF 95/648.

INTRODUCCION

Las nuevas tendencias de sistemas agropecuarios capaces de aprovechar los recursos existentes sin necesidad de grandes inversiones han contribuido a que la cabaña ovina en España y en otros países no haya seguido la drástica tendencia descendente observada en las últimas décadas. Tanto en nuestro país como en otras zonas del mundo el ganado ovino se ve afectado durante el pastoreo por numerosas enfermedades parasitarias, entre las que se encuentran, de forma destacada, las tricostrongilidosis, especialmente la hemoncosis, capaz de producir muerte en los corderos más jóvenes, así como importantes descensos productivos en los animales adultos, alterando, de esta forma, el bienestar del ganado.

En general, los animales adultos son capaces de responder de forma adecuada a la enfermedad; sin embargo, se ha mostrado en diversos estudios una diferente intensidad de respuesta entre animales pertenecientes a razas ovinas dispares, resultando unas razas notablemente más resistentes a la hemoncosis que otras, tanto en primoinfestaciones como en reinfestaciones. Incluso entre animales de la misma raza existen importantes variaciones interindividuales asociadas aparentemente al genotipo del hospedador. El aprovechamiento de esta diferente capacidad de respuesta a la enfermedad podría ser de utilidad, introduciendo animales más resistentes en las zonas con mayor riesgo de brotes de hemoncosis - zonas húmedas o bien zonas de regadío-, disminuyendo, de esta forma, la contaminación parasitaria ambiental de forma natural y sin necesidad de grandes gastos en productos antihelmínticos, etc. De igual manera, los descensos en la producción derivados de la infestación (peso vivo, leche o lana) así como la mortalidad de animales jóvenes serían menores.

Es posible, además, que estos animales fuesen capaces de responder también de forma adecuada a otras nematodosis de localización gastrointestinal, muy frecuentes en el ganado ovino, aunque menos patógenas que la hemoncosis, como son la tricostrongilidosis y ostertagiosis. Este hecho se ha comprobado en alguna ocasión, aunque, de momento no está claramente establecido. Sin embargo, la respuesta inmunitaria de carácter local podría ser igualmente adecuada y eficaz para nematodos similares y con parecida o idéntica localización, resultando, de esta forma, que los animales capaces de producir una correcta

respuesta inmunitaria en la zona afectada, se viesen libres de tricostrongilidosis en un sentido amplio.

Por otra parte, existe aún una cuestión en la hemoncosis ovina, así como en la mayoría de las parasitosis, que es necesario solucionar. La importancia de un diagnóstico específico, que pueda realizarse de forma rápida, automatizable y, además, capaz de detectar la enfermedad durante el periodo de prepatencia de la misma es evidente. Hasta el momento, sin embargo, no se dispone de un método con estas características, que por otra parte resultaría de gran ayuda a la hora de detectar de forma precoz la enfermedad, así como de gran utilidad en estudios epidemiológicos, para evaluar la capacidad protectora de determinadas vacunas o bien en estudios de resistencia farmacológica tan ampliamente establecida a nivel mundial.

Nuestro objetivo, por lo tanto, al desarrollar esta tesis doctoral, ha sido la de ayudar a comprender el comportamiento de los animales adultos frente a la hemoncosis desde un punto de vista inmunitario, con el fin de aprovechar las características de resistencia a la enfermedad propias de cada raza, así como el establecimiento de un diagnóstico inmunológico aplicable a animales distantes geográficamente y pertenecientes a diferentes razas o incluso a diferente grupo de edad, es decir, un diagnóstico multivalente.

1. REVISION BIBLIOGRAFICA

1.1. Agente etiológico de la hemoncosis ovina

H. contortus es un nematodo que parasita el abomaso de oveja y cabra, en ocasiones del ganado vacuno y excepcionalmente de cualquier otro rumiante. Pertenecce al género **Haemonchus** Cobb, 1898, Subfamilia Haemonchinae Skrjabin y Schulz, 1952, Familia Trichostrongylidae Leiper, 1912 (en Gibbons y Khalil, 1982). Existen unas doce especies parásitas dentro de su género, pero únicamente **H. contortus** y **H. placei** (ganado vacuno fundamentalmente) aparecen representados en las regiones templadas de la tierra.

H. contortus es fácilmente detectable a simple vista en su estadio adulto, presentando, debido a sus hábitos alimenticios -hematofagia-, una coloración rojiza en el intestino que en las hembras alterna con el color blanco de los cordones sexuales enrollados alrededor del tubo digestivo, lo que confiere al verme su coloración típica. Las hembras miden **ca.** 18-30 mm de largo y 0,4-0,5 mm de ancho, mientras que los machos se sitúan entre 10-20 mm de largo y 0,1-0,15 mm de ancho. Los machos poseen una bolsa copuladora caudal en la que se observan dos lóbulos laterales simétricos y un lóbulo dorsal asimétrico, además de dos espículas y un gubernáculo. En las hembras se puede apreciar una amplia solapa supravulvar en el cuarto posterior del cuerpo.

Los últimos estadios larvarios, así como los adultos, presentan una lanceta transparente en la cavidad bucal que facilita la hematofagia, y que resulta difícil de observar al microscopio óptico. La boca aparece rodeada de seis labios y seis papilas orales, pudiendo distinguirse además dos papilas cervicales con una función sensorial. Los estadios larvarios preparasitarios poseen una boca en posición terminal y un ano en posición lateral cerca del extremo posterior (Vray y col., 1988).

Las hembras adultas de **H. contortus** pueden eliminar hasta 10000 huevos diarios con las heces del hospedador al medio ambiente, donde eclosionan dando lugar a la larva de primer estadio, que posteriormente se desarrolla a larva de segundo estadio y finalmente larva infestante o L3, en un periodo que puede durar entre 4 y 6 días en condiciones favorables de

temperatura y humedad. La L3 migra de las heces (10 cm aproximadamente) y es ingerida con el pasto por el hospedador. En el rumen experimenta el desenvainamiento merced a la acción de ácido carbónico (H_2CO_3) procedente del hospedador (Petronijevic y col., 1985) y de algunas enzimas que podrían ser lipasas, pseudocolagenasas y leucina aminopeptidasa, enzimas también implicadas en la eclosión del huevo (Rogers, 1982).

La larva al llegar al abomaso penetra en su mucosa transformándose en L4. Tras su paso por este estadio larvario (L4), la fase preadulto emerge de la mucosa entre 7 y 14 horas postinfestación (Vray y col., 1988) para finalmente alcanzar el estado adulto. Sin embargo, existen determinados factores que condicionan la detención del desarrollo parasitario en el estadio de L4, como pueden ser infestaciones anteriores o la entrada en ovejas genéticamente resistentes, ciertos factores hormonales o incluso la administración de corticosteroides (Michel, 1974; Adams, 1986, 1988a). La distribución de los nematodos que parasitaban el abomaso de las ovejas ha sido estudiada por Dash (1985). Este autor observó que las L4 de **H. contortus** mostraban predilección por el área fúndica, disminuyendo el porcentaje de implantación hacia el área pilórica, mientras que las larvas de cuarto estadio de **Trichostrongylus axei** y **Teladorsagia circumcincta** presentaban una distribución bimodal en las áreas fúndica y pilórica. Los adultos de **H. contortus** y **Te. circumcincta** aparecieron con una localización algo posterior hacia el píloro, mientras que **T. axei** se localizó en ambas áreas indistintamente. En cabras se ha descrito un ciclo biológico muy similar (Rahman y Collins, 1990a).

Tras la cópula, la eliminación de huevos puede comenzar a partir del día 15 postinfestación (Soulsby, 1987). La fertilidad de los vermes parece verse afectada por el tamaño de la población en estudios realizados por Fleming (1988); sin embargo, Coyne (1991a, 1992) no encontró ninguna relación entre la magnitud de la población parasitaria (total o sólo hembras) y la fertilidad de las hembras.

La mortalidad del parásito resulta inversamente proporcional a la magnitud de la infestación, así como también se ve influenciada por la existencia de infestaciones homólogas previas, cuyo efecto permanece entre 3 y 9 semanas tras la finalización de la infestación (Coyne, 1991b, 1992).

La distribución poblacional de **H. contortus**, al igual que la de otros muchos nematodos gastrointestinales, en los rebaños es de tipo binomial, mostrando signos clínicos de infestación un número pequeño de animales, mientras que la mayoría sólo presentan cargas moderadas (Roberts y Swan, 1982b; Barger, 1985).

1.2. Distribución geográfica de **H. contortus**

H. contortus se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo, aunque suele causar mayores problemas en las regiones húmedas con clima templado, donde su desarrollo es óptimo (Blood y Radostits, 1989).

En la península ibérica se ha descrito con una distribución general en el Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos (Cordero del Campillo y col., 1994), aunque, en general, la prevalencia de las infestaciones por **H. contortus** en nuestro país no ha sido muy elevada en los rebaños estudiados (23,2%, Tarazona Vilas, 1974; 16,2%, Fernández-Díez, 1967; 9%, Martínez Gómez, 1985; 7%, Díez-Baños y col., 1989). En ocasiones, y en dependencia de los años de estudio, se encontraron incidencias del 57% en la zona centro de España (García Romero y col., 1993).

La climatología es un factor determinante para la aparición de las infestaciones por **H. contortus**, siendo necesarias temperaturas moderadas ($>15^{\circ}\text{C}$) y la aparición de lluvia. En las zonas de secano, en las que el déficit hídrico es el factor limitante, el nematodo está presente en los meses más húmedos del año, correspondientes al otoño, invierno y primavera (Canals Caballero, 1986); resultados similares (Octubre a Junio) han sido obtenidos en la zona Centro de España con posterioridad por Gómez García y col. (1993). Por el contrario, en aquellos lugares en los que existe un aporte hídrico suficiente, tales como los regadíos de Aragón, **H. contortus** aparece mayoritariamente en los meses de Mayo y Junio (Uriarte y Valderrábano, 1989) extendiéndose en ocasiones hasta el mes de Octubre (Uriarte, 1990).

1.3. Acción patógena de **H. contortus**

De una forma general, las infestaciones por nematodos gastrointestinales provocan, principalmente, alteraciones en el tracto digestivo de los animales afectados, lugar de implantación de los helmintos. Entre estas alteraciones se incluyen, la falta de apetito, alteraciones en la motilidad y flujo intestinal, en el pH del abomaso así como de ciertos niveles de hormonas gastrointestinales y determinadas secreciones; además se han descrito pérdidas de proteínas en el tracto gastrointestinal y un menor aprovechamiento energético (Holmes, 1986). Todas estas alteraciones se traducen, desde un punto de vista productivo, en la disminución de peso o menor ganancia del mismo por parte de animales infestados, así como menores rendimientos en la producción láctea y crecimiento lanar, tanto en ovejas como en cabras (Thomas y Ali, 1983; Rahman y Collins, 1990b; Blood y Radostits, 1989; Cobon y O'Sullivan, 1992; Hoste y Chartier, 1993).

Las infestaciones por **H. contortus** provocan importantes pérdidas económicas tanto en las infestaciones graves como en los casos más crónicos. En las cabras se evidenciaron pérdidas de peso y disminución de la productividad láctea, especialmente en los animales que más cantidad de leche producían (Rahman y collins, 1990b; Hoste y Chartier, 1993). El ganado ovino muestra menores ganancias de peso durante la preñez e incluso disminuciones de peso en la lactación de las madres, a la vez que que el aumento de peso de los corderos y el crecimiento lanar también se vieron afectados. Se han comprobado, asimismo, descensos en el rendimiento lácteo de más de un 23% (Thomas y Ali, 1983; Cobon y O'Sullivan, 1992).

La principal acción patógena en la hemoncosis es la pérdida de sangre, asociada a los estadios parasitarios que se alimentan de la misma, teniendo como consecuencia la disminución en el número de eritrocitos circulantes, aumento del volumen plasmático, reducción del valor hematocrito y una mayor tasa de producción de eritrocitos junto con un incremento en la absorción del hierro de la dieta; además aumenta el catabolismo de la albúmina (Abbott y col., 1986). Se han calculado pérdidas de sangre en el abomaso de hasta 253 ml por día en animales infestados con una dosis de 300 L3 por kg de peso vivo (Rowe y col., 1988). En estudios realizados por Roberts y Swan (1982a) se comprobó que los niveles de hemoglobina eran predecibles a partir del número de huevos

eliminados con las heces, pudiendo emplearse como un indicador sensible del estado de infestación del animal. Durante las infestaciones en el ganado caprino se observan alteraciones similares: pérdida de peso junto con anemia y disminución de las proteínas totales y albúmina séricas a las dos semanas postinfestación, encontrándose en algunos casos graves la presencia de diarrea (Rahman y Collins, 1990b), aunque éste es un signo que normalmente no se asocia con la hemoncosis, apareciendo, en ocasiones, constipaciones intestinales (Blood y Radostits, 1989).

La anemia puede desarrollarse en tres fases. En la primera fase existe una disminución progresiva del hematocrito junto con niveles normales del hierro sérico. Tras esta fase, que viene a durar unas 3 semanas, aparece la segunda fase caracterizada por la activación del sistema hematopoyético que produce una estabilización en los niveles de hematocrito, aunque continúan estando bajos. La segunda fase es de duración variable entre 1,5 y 3,5 meses aproximadamente, y finalmente aparece la tercera fase caracterizada por una pérdida tanto de proteínas como de hierro sérico (Dargie y Allonby, 1975).

Como consecuencia del asentamiento parasitario en el abomaso se observan cambios histológicos, evidentes a partir del día 12 post infestación, tales como alteraciones en la estructura de las glándulas gástricas, que aparecen con bordes menos definidos; hemorragias petequiales, hiperplasia de la mucosa y descamación de células epiteliales, más notables durante los días 18-22 postinfestación (Hunter y Mckenzie, 1982). El acúmulo, en la mucosa del abomaso, de eosinófilos dispersos así como agregados linfoides en mucosa y submucosa son evidentes. Estos últimos tipos celulares junto con mastocitos se encuentran en mayor número en ovejas inmunizadas que en corderos, apareciendo además en los animales adultos un incremento del número de células plasmáticas positivas para IgA, no tan evidente en los corderos (Salman y Duncan, 1985).

Se han hallado aumentos de la gastrina sérica así como de los niveles de pepsinógeno sérico tanto en ovejas como en cabras (Honde y col., 1985; Fox y col., 1991). Estos parámetros han sido utilizados como diagnóstico y seguimiento de las infestaciones, intentando en ocasiones diferenciar las infestaciones producidas por **H. contortus** de las producidas por **Te. circumcincta**, gracias a los tipos de pepsinógeno detectados en el suero de animales con diferentes

infestaciones; sin embargo no se encontraron tipos distintos entre sí en los dos casos (Mostofa y col., 1990).

Otros péptidos también han sido objeto de estudio durante las infestaciones por **H. contortus**. Se ha comprobado la elevación de los niveles en plasma de gastrina y de somatostatina al cabo de 1 y 4 horas postinfestación respectivamente, asociándose a la acción del parásito o bien a alguna sustancia liberada por las larvas desenvainadas que llegaban al abomaso. Por otra parte la inyección de extractos parasitarios tiene como consecuencia un incremento en los niveles plasmáticos de polipéptido pancreático (5-7 horas postinfestación), gastrina (3-4 horas postinfestación) y somatostatina (1-2 horas postinfestación), atribuyendo este último caso a una posible reacción inmunitaria desencadenada por la inyección de los extractos parasitarios (Honde y col., 1985).

1.4. Respuesta inmunitaria a **H. contortus**

En los animales se pueden diferenciar dos tipos de resistencia frente a las parasitosis; una de ellas es la resistencia innata, determinada por características estructurales, bioquímicas o fisiológicas del hospedador, que son capaces de evitar la implantación y/o maduración del parásito en un hospedador. Cuando la resistencia innata es de poca importancia en un animal, actúa entonces el sistema inmunitario para poder instaurar una resistencia a la invasión parasitaria. Los mecanismos efectores pueden ser específicos como la acción de anticuerpos y células T, o bien no específicos -desencadenados a su vez por mecanismos específicos- como es el caso de la respuesta inflamatoria.

En condiciones óptimas, el ganado ovino es capaz de responder de forma adecuada a las infestaciones parasitarias por tricostrongídeos, entre ellos **H. contortus**, eliminando la infestación patente o bien adquiriendo un estado inmunitario capaz de evitar reinfestaciones. Las respuestas provocadas son complejas, y en ellas intervienen anticuerpos, células T y componentes no específicos derivados de la médula ósea. Las células T ejercen su acción de forma indirecta ayudando a la producción de anticuerpos y al desencadenamiento de reacciones inflamatorias (eosinófilos, mastocitos y otros tipos celulares) y cambios fisicoquímicos en el tracto intestinal (Miller, 1984). Las reacciones son similares a las observadas en otros modelos parásito-hospedador

del tracto gastrointestinal más ampliamente estudiados (**Trichinella spiralis**, **Heligmosomoides polygyrus** y **Trichuris muris** -Wakelin, 1992-), e incluyen la dependencia de células CD4+, respuesta inflamatoria intestinal, capacidad de inmunomodulación de la respuesta del hospedador por parte del parásito y la influencia genética sobre la respuesta provocada (Miller, 1984; Wakelin 1992).

Entre estas respuestas se encuentra la exclusión inmune (Miller y col. 1983; Miller, 1984) que actúa durante los dos días siguientes a la infestación impidiendo el establecimiento de la población parasitaria ingerida. La autocuración es otro tipo de respuesta y está provocada por la ingestión de nuevas larvas infestantes teniendo como consecuencia la eliminación de la población parasitaria -adulto o preadulto- existente en el animal. En ambas respuestas se ha considerado la hipersensibilidad inmediata como un mecanismo efector importante en la eliminación de larvas ingeridas y de vermes ya establecidos.

La resistencia a las reinfestaciones es la situación más común en los animales adultos en pastoreo y se produce cuando los animales han sufrido repetidas infestaciones, con dosis larvarias no muy elevadas, a lo largo de los años en el pasto (Adams, 1983). Muy tempranamente se ha sugerido que la resistencia frente a las reinfestaciones está bajo control genético (Whitlock, 1955 -chequear; Wakelin, 1992).

La expresión de la respuesta del ganado ovino a las infestaciones por *nematodos gastrointestinales* comprende distintas alteraciones en los helmintos, entre las cuales destacan la reducción de su tamaño, descenso de la fertilidad, retraso en el desarrollo parasitario (Mulligan y col., 1961; Miller, 1984, 1986; Schallig; y algunos más)), además de reducciones en el número de vermes presentes en los animales resistentes (Adams, 1982; Zajac y col., 1990; Smith y col., 1984; Coyne y Smith, 1992; Emery y col., 1993; Schallig y col., 1995a; Stear y col., 1995). Se han descrito, asimismo, disminuciones en la excreción de algunos enzimas por parte de los helmintos cuando se encuentran en animales resistentes (i.e. colinesterasa en **T.colubriformis** -Douch y col., 1988-) o bien variaciones tanto en las cantidades totales como en la presencia de isoformas de algunos enzimas (Knox y Jones, 1992).

Aunque en líneas generales, las alteraciones descritas son la regla, en algunas ocasiones han sido señaladas cepas parasitarias de **H.contortus** que

no han visto modificado su potencial infestante a pesar de haber sido seleccionadas en ovinos resistentes o sensibles durante varias generaciones (Adams, 1988; Woolaston y col., 1992) o bien inmunosuprimidos (Albers y Burgess, 1988).

1.4.1. Regulación de la respuesta

La respuesta frente a los nematodos gastrointestinales, y específicamente frente a **H. contortus**, se produce en dos compartimentos: respuesta sistémica y respuesta local, en las que están implicados diversos mecanismos efectores de distinta importancia, caracterizándose la respuesta inmunitaria sistémica por su elevada especificidad.

Se asume que la regulación del sistema inmunitario en el ganado ovino es, en líneas generales, similar al descrito en especies mejor conocidas. Así, se admite que los antígenos parasitarios son presentados a las células T "helper" (Th, poseedoras del marcador celular CD4) en forma de complejo tras ser procesados. Este complejo se compone de un péptido derivado del antígeno y moléculas que forman parte del sistema principal de histocompatibilidad (MHC); las moléculas de tipo MHC I presentan los antígenos a los receptores de los linfocitos T citotóxicos (CD8+), mientras que las moléculas de tipo II lo hacen a los receptores de las células Th (in Hohenhaus y Outteridge, 1995). Esta función es realizada por las células presentadoras de antígeno: linfocitos B, células dendríticas y células del sistema mononuclear fagocitario. Como consecuencia, las células estimuladas son inducidas a una maduración acompañada de la correspondiente liberación de linfoquinas, desencadenando el tipo de respuesta correspondiente. Los linfocitos Th, responsables de la respuesta, se dividen a su vez en dos subpoblaciones: Th₁ responsable de la respuesta celular, y Th₂ responsables de la inmunidad mediada por anticuerpos. Estos procesos, a su vez, se encuentran regulados por las células T citotóxicas (ver Cox y Liew, 1992).

1.4.1.a. Anticuerpos circulantes

Se ha demostrado la presencia de anticuerpos frente a casi todos los estadios parasitarios. Charley-Poulain y col. (1984) realizaron estudios mediante ELISA de la respuesta sérica de corderos, infestados con dosis únicas del parásito, frente a extractos de L-3, adultos y huevos, encontrando en todos ellos un ligero incremento de anticuerpos específicos (IgG, IgA, IgM), que resultó más marcado en la reinfestación. Similares resultados han sido obtenidos más recientemente. También los productos de excreción/secreción de los vermes adultos se han utilizado como antígenos, resultando ser buenos indicadores de la infestación (Schallig y col., 1994b, Takáts y col., 1995). Además de comprobar la capacidad de inducción de anticuerpos específicos de estos estadios parasitarios, se ha puesto de manifiesto la diferente intensidad de la respuesta provocada por varias fases del ciclo biológico parasitario (mayor en L-3 que en adultos) (Byszewska-Spocinska y Stankiewicz, 1985; Cuquerella y col., 1991), así como la diferente dinámica en la producción de inmunoglobulinas inducida por los distintos antígenos, hallando una respuesta más precoz frente a L-3 que frente a adultos (Byszewska-Spocinska y Stankiewicz, 1985), o bien diferentes perfiles de anticuerpos con antígenos procedentes de L-3, fluido de desenvainamiento o adultos (Adams, 1993).

En ocasiones ha sido difícil encontrar una respuesta sérica provocada por infestaciones administradas en dosis únicas, especialmente si los animales empleados eran jóvenes, mientras que en presencia de un segundo estímulo antigénico, la respuesta resultaba más notable (Charley-Poulain y col., 1984; Cuquerella y col., 1991; entre otros). Sin embargo, en estudios realizados con animales de mayor edad, se encontraron respuestas notables de anticuerpos en las primoinfestaciones (Adams y Beh, 1981) sugiriendo la existencia de una memoria inmunológica al observar el adelanto de aparición de anticuerpos (IgG₁ e IgG₂) frente a estadios larvarios y adultos en las reinfestaciones (Schallig y col., 1994a). Por otro lado, se ha comprobado la existencia de una relación directa entre el título de anticuerpos séricos específicos y el número de infestaciones recibidas (Byszewska-Spocinska y Stankiewicz, 1985; Schallig et al., 1994a, 1995a).

No son abundantes los estudios de los isotipos y subclases de inmunoglobulinas implicados en la respuesta inmunitaria frente a **H. contortus**,

fundamentalmente por la falta de disponibilidad de reactivos. Así, todos los investigadores están de acuerdo en seguir la dinámica de producción de IgG específica, puesto que es la inmunoglobulina predominante en el suero, y la respuesta sérica provocada se debe en gran medida a ella. Al trabajar con las subclases IgG₁ e IgG₂, se han hallado incrementos de ambas durante el curso de las infestaciones, aunque más notable en el caso de la IgG₁, que es la mayoritaria (Schallig y col., 1995).

El papel de los anticuerpos circulantes en la protección del ganado ovino frente a **H. contortus** ha sido un tema controvertido por la disparidad de los resultados hallados en muchos casos. Duncan y col. (1978) sugirieron que la falta de respuesta de los corderos a las infestaciones por **H. contortus** se debe a su incapacidad para producir anticuerpos. También Smith y Christie (1978) encontraron una asociación entre las concentraciones de IgG séricas y la resistencia a la enfermedad. Sin embargo, Smith y Angus (1980), trabajando con la misma raza ovina (Scottish Blackface), no encontraron diferentes niveles de IgG séricas frente a L-3/L-4 entre corderos que no respondían a la enfermedad y ovejas que quedaron protegidas. En ambos estudios se utilizaron vacunas de larvas irradiadas y se midieron IgG frente al mismo extracto parasitario mediante RIA.

La falta de una clara correlación entre el nivel de IgG específica (anti-L3 o anti-adulto) y la protección observada en los ovinos infestados, estimada mediante la reducción de la eliminación fecal de huevos, se ha puesto de manifiesto en trabajos más recientes. En este sentido, Gamble y Zajac (1992) no observaron diferencias importantes en los niveles de anticuerpos específicos anti-**Haemonchus** entre dos razas ovinas (St. Croix y Dorset), a pesar de los hallazgos parasitológicos tan distintos. Cuquerella y col. (1994b) tampoco apreciaron en ganado Manchego una relación lineal aunque los autores sugieren algún papel protector para los anticuerpos, ya que los animales con menor nivel de inmunoglobulinas coincidieron con los que presentaron la mayor eliminación de huevos en heces. Por su parte, Gill (1991) postuló la importancia de los anticuerpos en la resistencia genética de ganado Merino a la enfermedad, especialmente los de tipo IgG₁ e IgA (Gill y col., 1993a).

1.4.1.b. Respuesta de base celular

La respuesta celular de carácter sistémico acompaña a las infestaciones por helmintos gastrointestinales. De hecho, la eosinofilia está presente, como norma, en muchas nematodosis gastrointestinales (ver p.e. Rothwell y col., 1993; Pernthaner y col., 1995a), con relativa independencia de su efecto protector. El papel relevante de la respuesta celular en la resistencia del ganado ovino a **H. contortus** ha sido demostrado por la transferencia de protección de animales inmunizados a animales receptivos, ya sea por su edad o por su capacidad de respuesta insuficiente. Esta protección se ha logrado mediante trasvase de linfocitos enteros en unos casos, o de linfocitos lisados en otros ("factor de transferencia").

Se ha logrado una eficaz transferencia de la respuesta inmunitaria protectora frente a **H. contortus** entre animales genéticamente idénticos, por el trasvase de linfocitos lavados, o bien linfa entera, de animales inmunes a animales receptivos, teniendo como efecto una disminución en la eliminación fecal de huevos, así como una reducción de la carga parasitaria de los animales receptores. Además se consiguió transferir una respuesta secundaria local de anticuerpos (IgA) (Smith y col., 1984). Este método se ha utilizado también con otras especies parásitas del abomaso (**Te. circumcincta**), logrando transferir una respuesta local (IgA y mastocitos) capaz de producir una inmunidad parcial en los animales receptores (Smith y col., 1986 y 1987). La transferencia de inmunidad sólo se conseguía cuando la linfa contenía al menos entre un 10 y un 20 % de linfoblastos (días 2 a 4 postinfestación) y no antes ni después (Smith y col., 1986). Estas observaciones refuerzan la teoría de la importancia de las células T en la respuesta protectora frente a la hemoncosis.

Por su parte Ross y col. (1978) han señalado una reducción de la carga parasitaria de un 34 % en animales de 4 meses y de un 45 % en animales de 7 meses respecto a los testigos utilizados, empleando para ello inoculaciones de lisados de linfocitos procedentes de ovejas adultas inmunizadas. La inoculación del llamado factor de transferencia, se ha utilizado con éxito en otras helmintosis gastrointestinales (**T. colubriformis**, **T. axei** y **Teladorsagia circumcincta**). El hecho de que pudiera aplicarse entre animales genéticamente disimilares (Ross y Halliday, 1979a y b) sugería la importancia de los productos derivados de las células en el traspaso de inmunidad. El grado de resistencia alcanzado en el

caso de infestaciones con **T.colubriformis** y **Te.circumcincta** resultó comparable al producido en un grupo de corderos que habían recibido una infestación previa (Ross y Halliday, 1979b), es decir, a una respuesta inmunitaria secundaria. La respuesta producida al inocular el "factor de transferencia" se ha asociado a una hipersensibilidad inmediata en la mucosa del abomaso de animales infestados con **H. contortus** (Hunter y col., 1983).

La respuesta celular sistémica se ha estudiado generalmente mediante la capacidad de proliferación de los linfocitos periféricos en sangre estimulados con antígenos parasitarios. La información obtenida en los ensayos, según se desprende de los informes publicados, es confusa y merece una exposición ya que mientras en algunos casos se han logrado estimulaciones notables (Haig y col., 1989; Gill y col., 1993b, entre otros) otros autores han obtenido resultados contrarios (Torgerson y Lloyd, 1992; Torgerson y Lloyd, 1993b).

Torgerson y Lloyd (1992) observaron que la linfoestimulación provocada por los antígenos de **H.contortus** se producía tanto en animales infestados como en animales que no habían tenido contacto previo con el helminto. En un análisis más detallado de los mismos autores (Torgerson y Lloyd, 1993b) se observó que la reactividad celular, observada en ovejas inmunes y corderos libres de parásitos, estaba provocada por las mismas fracciones antigénicas estudiadas (extractos solubles de L-3 separados mediante SDS-PAGE). Los autores explicaron esta respuesta como consecuencia de posibles reacciones cruzadas con antígenos bacterianos, y no relacionaron estas fracciones con la protección dado el reconocimiento por los animales no inmunes. No debería excluirse, además, la presencia en estas fracciones de sustancias mitogénicas o bien de antígenos compartidos con otros helmintos habituales en el ganado ovino.

Frente a estos resultados no concluyentes, los ensayos llevados a cabo por Haig y col. (1989), mostraron una linfoproliferación clara al enfrentar células mononucleares de sangre periférica a antígenos larvarios del parásito, observándose que los linfocitos fueron mayoritariamente de tipo CD4+. Estos resultados **in vitro** parecen ser confirmados, indirectamente por los obtenidos **in vivo** por Gill y col. (1993b), quienes consiguieron suprimir la respuesta desarrollada por ovejas genéticamente resistentes a la hemoncosis cuando eliminaron la población de células que portaban el marcador CD4, asociándose de esta forma la resistencia genética con la respuesta proliferativa de esta

población de linfocitos. Una evidencia indirecta está suministrada por los resultados obtenidos en las infestaciones con **T.colubriformis**. Así, Perthaner y col. (1995b) *comprobaron que las ovejas resistentes a nematodos gastrointestinales (infestadas en el pasto) portaban mayores porcentajes de linfocitos CD4+ y CD5+, mientras que las ovejas mantenidas como testigo mostraron mayores porcentajes de células T19+ ($\gamma\delta$) células T.*

Un aspecto que merece ser comentado es el componente celular de la posible inmunosupresión en la hemoncosis ovina. La capacidad de producir inmunosupresión en sus hospedadores fue sugerido en otros nematodos, incluso en el caso de infestaciones que afectan al abomaso del ganado vacuno (*i.e.* **Ostertagia**) (Klesius y col., 1984) y posteriormente confirmada. Sin embargo, Gill y col. (1991b), han demostrado que la capacidad de respuesta linfocitaria a mitógenos seguía intacta en cabras que sufrían hemoncosis, deduciendo así que los antígenos de **H. contortus** no inducían una inmunosupresión de carácter general.

La posibilidad de que la falta de respuesta a las infestaciones por **H.contortus** en ganado ovino menor de seis meses fuese de carácter específico ha sido apuntada por Torgerson y Lloyd (1992) sugiriendo que las poblaciones de linfocitos que muestran reactividad a los antígenos parasitarios inhiben de alguna forma la respuesta efectiva frente a **H. contortus**. La existencia de células responsables de que los animales muestren una menor respuesta a los nematodos gastrointestinales se ha demostrado en estudios realizados con ovejas primoinfestadas con **T. colubriformis** por McClure y col. (1995). Los autores pusieron de manifiesto la asociación existente entre la deplección de células CD8+ (células T citotóxicas) y células T $\gamma\delta$ de la circulación sanguínea mediante administración de anticuerpos monoclonales y el consiguiente incremento de la resistencia (hasta un 88% en algunos casos), aunque estas células no se vieron afectadas en la mucosa gastrointestinal.

Como resumen, no parece claro el papel de los linfocitos Th1 en la respuesta protectora desarrollada en el ganado ovino tras las infestaciones y reinfestaciones, naturales o experimentales con **H.contortus**, especialmente en el caso de los animales genéticamente resistentes al helminto ya que Gill y Altman (1995) hallaron mayores niveles de IFN- γ en animales no infestados que en animales que sufrían la infestación. Asimismo advirtieron un dramático descenso de esta linfoquina a lo largo de la infestación con el parásito.

1.4.2. Respuesta local

Las infestaciones por helmintos suelen provocar en el hospedador una reacción inflamatoria característica, similar en muchos aspectos a las desencadenadas en procesos alérgicos. La hipersensibilidad inmediata, considerada como responsable de la eliminación de vermes en las reacciones denominadas de autocura, está compuesta de un incremento en los niveles de IgE, aumento de mastocitos, glóbuloleucocitos, así como elevación de los niveles de basófilos y eosinófilos, tanto circulantes como locales. Además parecen intervenir inmunoglobulinas secretoras que aparecen en las superficies mucosas del organismo, especialmente las de tipo A, así como IgG₁ e IgG₂ en el caso de los rumiantes (Lascelles y col., 1986).

1.4.2.a. Anticuerpos en la mucosa

Las inmunoglobulinas más ampliamente estudiadas han sido las IgA, puesto que se las considera parte fundamental de la respuesta inmunitaria de las mucosas. También han sido tenidas en cuenta las IgG, ya que en el caso de los rumiantes aparecen en cantidades muy elevadas en las mucosas, y en mucho menor medida las IgM.

Generalmente los anticuerpos locales se han estudiado en el propio lugar de implantación de **H. contortus**, aunque en ocasiones se ha utilizado, como medida indirecta de los niveles locales, la determinación de las inmunoglobulinas de extractos fecales para seguir el curso de las infestaciones, al existir correlación entre ambos parámetros, especialmente en el caso de la IgA (Wedrychowicz y col., 1984).

En la hemoncosis la procedencia de los anticuerpos locales en la mucosa del abomaso de los ovinos infestados parece ser diferente en dependencia de la clase de inmunoglobulina considerada. Se observó que las ovejas inmunizadas parenteralmente con antígeno larvario (L-3) del helminto mostraron notables incrementos de IgG (sérica y de abomaso) y la respuesta gástrica de IgA fue escasa. Sin embargo, ovejas hiperinfestadas mostraron grandes niveles de IgA, lo que sugería que las IgA se producían fundamentalmente de forma local,

mientras que la mayoría de las IgG encontradas provenían del suero (Smith, 1977a y b).

Wedrychowicz y col. (1984) apoyaron esta hipótesis, relacionando el mayor nivel de IgG específicas halladas en heces -como estimación de la respuesta en abomaso- cuando la lesión provocada en la mucosa por el verme resultó mayor, lo que facilitaría la salida de IgG del torrente circulatorio hacia el tracto gastrointestinal. El origen diferente de estos isotipos ha sido confirmado por Lascelles y col. (1986).

El estímulo antigénico para la producción y elevación de los niveles de anticuerpos en la mucosa gástrica es suministrado por las larvas infestantes de **H. contortus** tras su ingreso en el hospedador (Byszewska-Spocinska y Stankiewicz, 1985); parece ser dependiente de la dosis infestante y/o de la historia previa de los animales infestados (Charley-Poulain y col., 1984) y para el mantenimiento de los niveles elevados de IgA e IgG en abomaso es necesaria la persistencia del estímulo antigénico (Smith, 1977b), hecho también observado en las infestaciones ovinas por **Te. circumcincta** (Smith y col., 1987).

A pesar de que en algunos casos no se ha observado ninguna relación entre los niveles de anticuerpos específicos anti-**Haemonchus** en la mucosa gástrica y los niveles de protección de los hospedadores (Smith y Angus, 1980; Gamble y Zajac, 1992) la opinión más generalizada es que las inmunoglobulinas locales son responsables en parte de una respuesta inmunitaria efectiva.

Smith (1977a y b) en experimentos realizados con ovejas hiperinfestadas y con corderos que no respondieron a la enfermedad halló elevadas niveles de IgA en el abomaso en las primeras, mientras que los corderos no mostraron respuesta. También Duncan y col. (1978) relacionaron el hecho de que los corderos no fuesen capaces de responder a las infestaciones por **H. contortus** con un bajo nivel de IgA en la mucosa gástrica, así como de IgG en el suero. Aunque no directamente comparable, por la falta de repetibilidad de los experimentos de autocuración, Charley-Poulain y col. (1984) encontraron una relación temporal entre la reacción de autocura en corderos de 7 meses (Préalpes du Sud) y los niveles de anticuerpos locales (IgA) anti-**Haemonchus** hallados.

Una línea de evidencia similar es la suministrada por los ensayos de inmunización con larvas irradiadas, en los que se relacionaron los niveles de IgG e IgA de abomaso en corderos Blackface de 9 meses con la resistencia a reinfestaciones (Smith y Christie, 1978). En estudios más recientes, Gill y col. (1993a) han sugerido asimismo un papel importante para las IgA e IgG₁ específicas, tanto séricas como locales, en la inmunidad desarrollada por corderos merinos (6 meses) genéticamente resistentes a la hemoncosis. Posteriormente, mediante estudios inmunocitoquímicos se ha observado que el incremento de células de abomaso positivas para IgA e IgG₁ parásito-específicas era significativamente mayor en corderos genéticamente resistentes al helminto que en corderos escogidos al azar (Gill, 1994).

Este papel relevante de los anticuerpos locales en la resistencia de ganado ovino podría explicarse, de forma indirecta, por la posibilidad de que el incremento de la eliminación fecal de huevos en el periparto de las ovejas fuese debida a una disminución temporal en los niveles de anticuerpos de abomaso, que podrían migrar hacia la glándula mamaria, lo que a su vez permitiría un mayor desarrollo de los vermes inhibidos así como un mayor asentamiento de los vermes que ingresan de nuevo (Jeffcoate y col., 1992).

1.4.2.b. Células inflamatorias

La respuesta inmunitaria de los ovinos a las infestaciones por tricostrongídeos parece estar ligada a una reacción local inflamatoria que generalmente precede a la eliminación de vermes y en la que pueden intervenir basófilos, eosinófilos, mastocitos y glóbuloleucocitos. Esta respuesta inflamatoria parece escasa en los primeros meses de vida del animal, para posteriormente desarrollarse de forma completa (Adams, 1983; Berezhko y col., 1987). La relativa incapacidad de respuesta detectada en los animales jóvenes parece debida a una menor población de células responsables de estos procesos en los primeros meses de vida (Douch, 1988). Este autor comprobó que al mismo tiempo que los corderos crecían (de 2 a 4 meses), los eosinófilos y mastocitos incrementaban sus poblaciones en la mucosa intestinal.

La resistencia a las reinfestaciones ha sido asociada en muchas ocasiones con el incremento de mastocitos y glóbuloleucocitos en la mucosa. En

infestaciones de ovejas (Greyface x Suffolk, 10 meses) con **H. contortus**, Huntley y col. (1992) observaron la existencia de una estrecha relación entre el incremento de mastocitos y glóbulo leucocitos con la incapacidad de establecimiento de las larvas ingeridas. Esta respuesta celular, sin embargo, parece disminuir notablemente a los 42 días, para no existir al cabo de aproximadamente 3 meses sin tener contacto con el parásito. Además la respuesta se mostró muy sensible a la acción de los corticosteroides, que produjeron una disminución de los mastocitos hasta niveles basales. Asimismo, los números de leucocitos globulares en merinas genéticamente resistentes disminuyeron drásticamente en los tratamientos con dexametasona (Presson y col., 1988), hasta igualarse con los valores detectados en animales receptivos, y permitiendo de esa forma la implantación de **H. contortus**.

También en infestaciones con otros trichostrongílidos parecen desempeñar una función importante estas células. La actividad de mastocitos y glóbulo leucocitos, así como su número se incrementó en ovejas adultas (Romney y Merina) inmunes frente a **T. colubriformis** cuando se compararon con ovejas susceptibles (Douch y col., 1986; Bendixsen y col., 1995). Este hecho se ha comprobado también en el caso de **Te. circumcincta**, junto con el incremento de eosinófilos locales (Stevenson y col., 1994).

En estudios realizados recientemente por Bendixsen y col. (1995) con infestaciones monoespecíficas en merinos adultos, la respuesta apareció diseminada a lo largo de todo el intestino delgado, aunque la actividad de mastocitos, así como el número de leucocitos globulares, se mostraron más elevados en los lugares de preferencia de los vermes, esto es, abomaso en el caso de **H. contortus** y primeros tramos del intestino delgado en el caso de **T. colubriformis**.

Los basófilos en las infestaciones parasitarias en algunas especies de modelos experimentales (*i.e.* cricetos) muestran una respuesta en piel e intestino, entre otros tejidos, pero no es éste el caso del ganado ovino. Estas células parecen tener poca importancia en las respuestas inflamatorias de las ovejas, incluidas las causadas por infestaciones parasitarias gastrointestinales (Rothwell y col., 1994).

McClure y col. (1992) estudiaron el fenómeno de la expulsión de vermes en animales inmunes a **T. colubriformis**. En el trabajo realizado prestaron

especial atención a los linfocitos T de la mucosa intestinal. Encontraron una asociación entre el momento de expulsión de los vermes (entre los días 3 y 14 postinfestación) y la infiltración en la lámina propia intestinal de células T, así como su activación y diferenciación. La expansión incluyó a células T19- ($\gamma\delta$ células T) en la mucosa intestinal aunque su función todavía no ha sido aclarada.

Se han realizado numerosos estudios sobre las sustancias liberadas por las células implicadas en las respuestas inflamatorias, y generalmente se las ha relacionado con la expulsión de vermes, su papel no está definitivamente establecido. Como potencial forma de actuación se les ha imputado tanto la alteración del medio parasitario como la posible lesión directa a los parásitos (Steel y col., 1990).

La proteinasa de mastocitos ovinos (SMCP) se ha relacionado con un estado inmunitario capaz de eliminar los vermes parasitarios. Huntley y col. (1987) señalaron el incremento de la proteinasa en los tejidos de asentamiento parasitario en animales inmunes, cuando éstos sufrían infestaciones con dosis elevadas de **H. contortus** o bien **Te. circumcincta**. Jones y col. (1992) provocaron la liberación de SMCP a partir de mastocitos aislados de la mucosa intestinal de ovejas infestadas (**T. colubriformis**) tras ser estimulados con antígeno parasitario, y, en estudios posteriores, le atribuyeron algún papel en la expresión de la inmunidad (Jones y col., 1994). Además, en experimentos más recientes (Bendixsen y col., 1995), se ha demostrado que la mayor liberación de SMCP ocurría en los mastocitos de ovejas inmunes aislados a partir del lugar del asentamiento parasitario (principalmente abomaso y en menor medida duodeno en **H. contortus** o bien duodeno en **T. colubriformis**). En este estudio se demostró la reactividad cruzada entre ambos tricostrongílidos para provocar la liberación de la proteinasa.

También se han tenido en cuenta otros mediadores de la inflamación como la histamina. Generalmente los autores parecen de acuerdo en atribuirle algún papel en la expulsión de vermes, especialmente de **T. colubriformis** (Steel y col., 1990; Jones y col., 1990; Jones y Emery, 1991). Sin embargo esta opinión no fue compartida por Douch y col. (1984), quienes al estudiar animales que pastaban los dividieron en dos grupos según la alta o baja eliminación fecal de huevos, comprobando que entre ellos no existían diferencias en los niveles de histamina en sangre o en las secreciones intestinales.

Además, se han detectado incrementos en los niveles de otras sustancias como es el caso de ciertos metabolitos vasoactivos derivados del ácido araquidónico: leucotrienos, prostaglandinas (prostaciclina) y tromboxanos (Jones y Emery, 1991). Los niveles de leucotrienos se encontraron especialmente elevados durante la expulsión de **T. colubriformis** por parte de ovejas inmunizadas. En 1994, Jones y col. atribuyeron a los leucotrienos algún papel en la expresión de la inmunidad frente a este nematodo. Sin embargo, estudios recientes (Emery y McClure, 1995) no parecen apoyar el posible papel de estos mediadores de la inflamación en la expulsión del verme. Los autores sólo consiguieron una disminución notable en la expulsión de los vermes (70 % aprox.), y por tanto en la respuesta inmunitaria, cuando se les suministraba dexametasona, mientras que ninguno de los compuestos antagonistas de leucotrienos, prostaglandinas o factor de activación plaquetario produjeron el mismo efecto, lo que sugiere que están bajo control inmunitario.

1.5. Factores que influyen en la respuesta ovina

El ganado ovino muestra una gran variabilidad en el grado de resistencia a las infestaciones por helmintos. Esto es el resultado de un número de factores entre los que se encuentran, entre otros, la edad, el sexo, el estado del ciclo reproductor, la genética y el plano nutricional del ganado (Whitlock, 1955; Miller, 1986; Windon, 1990a; Gruner, 1991; entre otros muchos). Esta variabilidad del ganado se expresa tanto en la supresión del establecimiento de una infestación parasitaria ("resistance") como en la capacidad de los hospedadores de mantener un buen nivel productivo aún cuando estén infestados ("resilience") (Albers y col., 1987).

1.5.1. Agente etiológico

La capacidad del agente etiológico de la hemoncosis ovina de desencadenar una respuesta inmunitaria en el hospedador puede verse afectada por algunos factores. Se ha comprobado que el almacenamiento de L3 del parásito por largos periodos de tiempo tuvo como consecuencia cambios en la estructura proteica larvaria (Kooyman y Eysker, 1995) y, por lo tanto, la

antigenicidad de las larvas podría verse afectada por el tiempo de almacenamiento; de esta forma, la respuesta desencadenada en el hospedador al ingerir estas larvas sería menor (Thomas y col., 1975).

1.5.2. Parámetros fisiológicos

Las características fisiológicas del hospedador tienen gran influencia sobre la respuesta que éste es capaz de desencadenar ante la infestación parasitaria. La edad, el sexo o bien los niveles de ciertas hormonas, así como el estado nutricional de los animales son los parámetros que han merecido más atención en el estudio de las tricostrongilosis y, en particular de la hemoncosis ovina.

1.5.2.a. Edad de los animales

La edad de los hospedadores y su relación con el desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora ha sido un aspecto estudiado ampliamente. En líneas generales los rumiantes de mayor edad son capaces de responder más adecuadamente que los hospedadores jóvenes. Ello es particularmente cierto - aunque no exclusivo- en el caso de las infestaciones por **H. contortus** en el ganado ovino, de forma que mientras que corderos de menos de seis meses de edad pueden desarrollar una respuesta eficaz frente a las infestaciones por **Trichostrongylus spp**, normalmente la capacidad de respuesta frente a **H. contortus** aparece en los animales de más de seis meses e incluso más tarde (Manton y col., 1962; López y Urquhart, 1967).

Las razones invocadas para justificar esta tardía respuesta en la hemoncosis ovina han sido variadas y, entre ellas, merecen ser destacadas la tolerancia inducida por la transferencia de elementos inmunosupresores de la madre con la lactación (Soulsby,) y especialmente el lugar de implantación (abomaso) de esta especie parásita y desarrollo ontogenético del sistema inmunitario ovino.

Los nematodos de localización intestinal son capaces de provocar una mejor respuesta en animales jóvenes que los nematodos de localización gástrica

(Taylor y Thomas, 1986), ya sea por su menor antigenicidad intrínseca o por la mayor tolerancia del abomaso a las sustancias potencialmente antigénicas. Cuando se ha comparado la respuesta de animales de 2-4 meses de edad con animales de más de un año, mientras los primeros no han sido capaces de responder, los mayores redujeron la población parasitaria, la fertilidad o el tamaño de los vermes de forma evidente (Duncan y col., 1978; Ross y col., 1978).

La influencia de las células del sistema inmunitario parece ser responsable, no tanto por su escasez en animales jóvenes, sino por la diferente proporción de poblaciones celulares que presentaron respecto a los adultos, tanto en sangre y linfa como en piel (Watson y col., 1994). Se ha hallado un menor porcentaje de células CD4⁺ así como una menor capacidad de producir IFN- γ al estimular cultivos linfocitarios de animales de 4-8 meses cuando se compararon con los animales de 3-6 años de edad. Los animales jóvenes, sin embargo, presentaban mayor proporción de células B y T19⁺.

Además, cuando se ha estudiado la respuesta celular *in situ* ésta es más rápida en animales según incrementaba la edad de los mismos, especialmente en el caso de mastocitos y glóbuloleucocitos, según comprobaron Douch y Morum (1993) en ovejas Romney durante el curso de infestaciones naturales con tricostrongídeos. Incluso en animales no infestados también se halló una menor cantidad de leucocitos globulares en los individuos más jóvenes, mientras que su número aumentó con la edad de los mismos (Douch, 1988).

Esta menor respuesta de los corderos respecto a los adultos ha sido también observada en los niveles de anticuerpos circulantes anti-**Haemonchus**, de forma que en general no se aprecia una respuesta evidente en animales menores de 4-6 meses de edad (Duncan y col., 1978; Charley-Poulain y col., 1984; Cuquerella y col., 1991; Watson y Gill, 1991).

1.5.2.b. Influencia del sexo de los hospedadores

Las diferencias entre machos y hembras en algunos sistemas parásito-hospedador en cuanto a susceptibilidad a las infestaciones han sido observadas en numerosas ocasiones, tanto en modelos de laboratorio, como en condiciones naturales. Se ha considerado que, en general, las hembras

responden de forma más adecuada a las infestaciones por nematodos (Barger, 1993). En el caso de las infestaciones por **H. contortus**, en ganado merino en pastoreo, Luffau y col. (1981) observaron menores valores de eliminación fecal de huevos en las hembras, así como una mayor proporción en las reacciones de autocuración en las mismas. La mayor resistencia de las hembras a las infestaciones por **H. contortus** fue comprobada en fechas más recientes, en merinos, por Adams (1989) y en otras razas por Courtney y col. (1985a). Sin embargo, en estudios realizados con una alto número de animales -de escasa edad- no se hallaron diferencias significativas entre ambos sexos (Albers y col., 1987).

Dentro de las particularidades de las hembras en cuanto a las infestaciones por tricostrongílidos encontramos la elevación de la eliminación fecal de huevos del parásito alrededor del parto. Esta elevación periparto ha sido observada desde hace muchos años y suele comenzar una semana antes del parto para prolongarse durante 4-6 semanas después del nacimiento de los corderos. Por la época de presentación generalmente ha sido asociada al periodo de lactación. Además se ha hallado una relación directa entre el número de corderos criados (1, 2 ó más) y la elevación de huevos del parásito en las heces del hospedador (Gruner y col., 1992).

El nivel de esta elevación periparto parece guardar una relación inversa con el grado de resistencia de las hembras antes de la gestación y el parto. Así, en hembras pertenecientes a razas más resistentes a la hemoncosis (Florida Native) se demostró una elevación periparto prácticamente nula, mientras que las hembras Dorset/Rambouillet en las mismas condiciones sí mostraron esta elevación de forma evidente , cuando se comparó cada raza con su testigo correspondiente (Zajac y col., 1988). Por otra parte Courtney y col. (1986) demostraron esta relación inversa entre resistencia y elevación periparto entre líneas pertenecientes a la misma raza (Florida Native), que mostraron diferente sensibilidad a la enfermedad.

Aunque las causas íntimas de este fenómeno no están del todo establecidas, los diversos autores estuvieron de acuerdo en la existencia de una relajación del sistema inmunitario de la madre, dando como consecuencia la maduración de larvas inhibidas, el incremento en el establecimiento de nuevos vermes, o el aumento de la fecundidad de las hembras parásitas existentes en el hospedador. Una parte del fallo de la inmunidad de la oveja gestante podría

explicarse mediante los cambios cualitativos de anticuerpos (IgM, IgG₁ e IgG₂) observados durante la gestación (Reynolds y Griffin, 1990) y movilización de distintos isotipos (IgG₁; Pellerin y col., 1990; IgA: Jeffcoate, 1992) hacia la glándula mamaria a partir de los últimos días de la gestación, lo que incrementaría la receptividad de las hembras a los nematodos gastrointestinales.

Las hormonas producidas endógenamente por la hembra gestante se han considerado como responsables de este fallo inmunitario durante el parto. Este es el caso de la prolactina y la progesterona, que se han relacionado con la elevación de huevos periparto ocurrida tanto en ovejas (Fleming y Conrad, 1989) como en cabras (Rahman y Collins, 1992). La prolactina pareció tener un efecto positivo sobre el tamaño y fecundidad de las hembras de **H. contortus** cuando se administró a dosis similares a las que producen las hembras en lactación de forma endógena, siendo el incremento de la fecundidad un factor considerado como componente importante de la elevación de huevos periparto (Fleming, 1993). La existencia de interacciones entre la prolactina y el sistema inmunitario ha sido evidenciada en muchas ocasiones (SkwarXo-Sonta, 1992).

Sin embargo, las observaciones llevadas a cabo por Coop y col. (1990) mostraron una ligera anticipación en la elevación de la eliminación de huevos de **Te. circumcincta** respecto al pico de prolactina, lo que sugería que existían otros factores además de o en lugar de la prolactina que podrían ser los responsables del inicio de la elevación periparto, ya que además, los mismos autores no observaron esta elevación periparto en ovejas no preñadas ni paridas en las que reprodujeron de forma artificial la producción de leche, así como picos de prolactina en sangre similares a los encontrados en hembras gestantes. Las dudas sobre el papel de la prolactina en este fenómeno fueron a su vez formuladas por Jeffcoate y col. (1990), quienes no observaron ninguna alteración ni en la inmunidad humoral (mediante ensayos de hemaglutinación) ni en la celular (mediante pruebas de tuberculinización) a causa de la prolactina. No obstante, es posible que si bien la prolactina no altera la respuesta inmunitaria de carácter sistémico, sí altere en cambio la respuesta local (Jeffcoate, 1992), desempeñando por tanto un papel relevante en la relajación del sistema inmunitario ovino.

Otros tipos celulares, tales como mastocitos y eosinófilos, podrían ver comprometidas sus funciones durante la época periparto, mediante algunos factores liberados por el sistema neuroendocrino (Jeffcoate y col., 1990). En

cualquier caso, las relaciones entre el sistema inmunitario y el sistema neuroendocrino deberían ser exploradas con más amplitud (Barger, 1993).

1.5.2.c. Influencia de otros factores

La malnutrición, y sobre todo la deficiencia de proteínas en la dieta, tiene consecuencias perjudiciales sobre la inmunidad adquirida frente a **H. contortus** (Roberts y Adams, 1990). Este efecto resultó más marcado en animales jóvenes (5 meses, Merino), mientras que los animales con una edad suficiente para desarrollar una buena respuesta inmunitaria (8 meses, Scottish Blackface) alimentados con un nivel bajo de proteínas en la dieta respondieron de igual forma a la vacunación con larvas irradiadas que aquellos animales que fueron alimentados con un nivel alto de proteínas en la dieta (Abbot y Holmes, 1990). Sin embargo las diferentes razas parecen un factor a tener en cuenta, dado que Abbot y col. (1985) encontraron diferencias en la eliminación fecal de huevos en animales Finn Dorset de 3 meses de edad con dos planos nutricionales diferentes, mientras que en la raza Scottish Blackface no se encontraron diferencias entre los dos grupos de animales.

La influencia del selenio en las inmunodeficiencias o sobre el correcto funcionamiento del sistema inmunitario se ha planteado en numerosas ocasiones. Sin embargo, en animales alimentados con dietas altas y bajas en selenio, este elemento no influyó sobre la capacidad de respuesta de los animales a la hemoncosis (Jelinek y col., 1988), así como tampoco lo hizo en la respuesta frente a las tricostrongilidosis causadas por **Te. circumcincta** o **T. colubriformis** (McDonald y col., 1989).

1.5.3. Genotipo

Las diferencias de comportamiento frente a infestaciones parasitarias observadas entre los distintos rebaños o entre animales de localizaciones geográficas dispares han atraído desde hace tiempo la atención y el esfuerzo de muchos investigadores. Whitlock (1955) llevó a cabo una serie de experimentos con el fin de comprobar el comportamiento diferencial entre animales, así como la

posibilidad de transmisión a la descendencia de los supuestos caracteres genéticos responsables de la resistencia de los ovinos a la tricostrongilidosis.

A partir de estos estudios se han buscado marcadores de resistencia genética, raciales e intrarraciales de tipo directo (número de vermes, huevos eliminados, etc) o indirecto (tipo de hemoglobina, OLA, etc), capaces de discernir entre animales más o menos resistentes a las parasitosis (Kassai y Sréter, 1992; Kloosterman y col., 1992; Stear y col., 1994 y 1995; Hohenhaus y Outteridge, 1995; entre otros). Sin embargo hasta el momento no se ha identificado un marcador determinante de resistencia, y posiblemente los marcadores existentes (sexo, peso vivo, hematocrito y eliminación fecal de huevos) sean suficientes para determinar resistencia en la hemoncosis, al menos en corderos Scottish Blackface (Stear y col., 1995).

1.5.3.a. Variaciones raciales

Las observaciones realizadas han permitido que en algunos sistemas parásito-hospedador se haya empleado con éxito la diferente capacidad de resistencia de las distintas razas para combatir algunas enfermedades. Este ha sido el caso de la tripanosomosis y las infestaciones con garrapatas en bovinos (en Gray y Gill, 1994).

La resistencia a la hemoncosis se ha asociado en numerosas ocasiones a una raza determinada, basándose en menores eliminaciones fecales de huevos del parásito o bien en alteraciones fisiopatológicas menos marcadas. Este ha sido el caso de la raza Florida Native, cuyos individuos mostraron en diversos estudios una mejor respuesta frente a **H. contortus** cuando se les comparó con individuos de otras razas (Radhakrishnan y col., 1972; Courtney y col., 1985a y b y Gamble y Zajac, 1992). A su vez los animales Scottish Blackface fueron considerados por Altaif y Dargie (1978a) como una raza de mayor resistencia a la hemoncosis que los animales de raza Finn Dorset. Otros animales considerados resistentes a la enfermedad han sido los pertenecientes a la raza Saint Croix , quienes mostraron en varios estudios realizados tanto con infestaciones naturales (Gamble y Zajac, 1992) como con infestaciones experimentales (Courtney y col., 1985a; Zajac y col., 1990) menores cargas parasitarias,

eliminaciones de huevos más bajas a lo largo de las infestaciones, así como menores descensos de los valores de hematocrito.

La raza Dorset, por el contrario, aparece en distintos estudios con una gran sensibilidad a la infestación por **H. contortus**, mostrando eliminaciones fecales de huevos muy elevadas, altas cargas parasitarias así como alteraciones importantes en los índices hemáticos estudiados (Altaif y Dargie, 1978; Courtney y col., 1985a; Zajac y col., 1990 y Gamble y Zajac, 1992). Esta mayor receptividad a la enfermedad se asoció con una menor capacidad de los corderos Dorset para producir glóbuloleucocitos en el abomaso (Gamble y Zajac, 1992).

Preston y Allonby (1979a) compararon un número mayor de razas, estableciendo una gradación de resistencia a la hemoncosis en infestaciones naturales en Kenia; los animales más resistentes resultaron los de raza Red Massai (raza autóctona), mientras que la Hampshire se mostró como la raza más susceptible. Las razas introducidas con el fin de mejorar la productividad de las razas locales (Blackhead Persian, Merino, Dorper y Corriedale) mostraron una resistencia intermedia a la hemoncosis. A su vez, Courtney y col. (1985a) compararon diferentes razas mediante infestaciones experimentales con **H. contortus** en corderos, imputando, igual que otros autores, la mayor resistencia a la raza Saint Croix y la menor a los corderos de raza Dorset; los animales de raza Florida Native, Barbados Blackbelly y 3/4 de Saint Croix aparecieron con una resistencia intermedia al parásito. Los autores sugirieron que los corderos más resistentes fueron los que se mostraron capaces de desarrollar inmunidad a la hemoncosis a una edad más temprana.

La información, a este respecto, en España es hasta donde sabemos muy escasa. Se han realizado estudios sobre la cinética de contaminación en pastos en las razas Talaverana (García Romero y col., 1993), Manchega (Gómez García y Blázquez Merino, 1994) y Aragonesa (Uriarte y Valderrábano, 1989), así como algunos estudios sobre la respuesta inmunitaria de corderos y ovejas de raza Manchega a las infestaciones experimentales por **H. contortus** (Cuquerella y col., 1991, 1993, 1994 a y b), pero no existen estudios comparativos entre ellas.

Consideramos este aspecto de interés, teniendo en cuenta que en España existen más de 28 variedades raciales autóctonas y un número importante de razas extranjeras incorporadas, así como numerosos cruces con el fin de mejorar la producción de corderos o bien de leche y que, España presenta el segundo

censo ovino de la Unión Europea, con 23 millones de cabezas (23,8%) sólo detrás del Reino Unido (29,6 millones; 30,6% del censo europeo) (MAPA, 1994). Las razas autóctonas más importantes numéricamente son, en orden decreciente, las siguientes: Merina (y derivados), Aragonesa, Churra, Castellana y Manchega; estas dos últimas, así como la Aragonesa (Rasa) pertenecen al tronco entrefino, mientras que las otras dos razas poseen troncos propios (tronco merino y tronco churro). Las razas Merina, Churra, Castellana y Manchega representan aproximadamente el 50% del censo ovino español. Cada una de estas razas contiene entre 1,5 y 3 millones de cabezas en nuestro país (Sánchez Belda y Sánchez Trujillano, 1986).

1.5.3.b. Variaciones intrarraciales.

Las características genéticas de cada individuo pueden determinar el grado de resistencia a las tricostrongilidosis. Este hecho puede ser aprovechado mediante su transmisión a la descendencia creando líneas de animales con diferente susceptibilidad a las parasitosis. Dineen y col. (1978) establecieron el concepto de animales "respondedores" y "no respondedores" en función de la respuesta obtenida cuando los corderos se vacunaron con larvas irradiadas de **T. colubriformis**. En otros estudios, los animales se agruparon en "altos respondedores" y "bajos respondedores" (Outteridge y col., 1985), categorías equivalentes a las anteriormente citadas de Dineen y col. (1978).

A través de la selección genética se han establecido varios rebaños de ovejas resistentes a diversos tricostrongílidos (ver Kassai y Sréter, 1992, Woolaston, 1990). La capacidad de transmisión de esta característica a la descendencia se ha estimado entre 0,3 y 0,5 en estudios realizados con **T. colubriformis**, así como con **H. contortus** (Albers y col., 1987; Windon, 1990; Sréter y col., 1994). Estos valores resultaron similares a los alcanzados en la selección genética de otros caracteres productivos tales como ganancia de peso o calidad de lana (Kassai y Sréter, 1992).

Un factor importante a tener en cuenta en la selección de resistencia frente a parásitos es que ésta no afecte a otras características productivas de forma negativa (Piper, 1987). Albers y col. (1987) comprobaron que los animales más resistentes a **H. contortus** no vieron afectada su productividad. Sin embargo,

en ocasiones se ha asociado de forma adversa la resistencia genética parasitaria y la fertilidad, aunque este aspecto todavía ha quedado sin aclarar (Woolaston, 1990). Además se ha estimado que el incremento de resistencia podría ser de un 30% en 12 años en el caso desfavorable de que esta capacidad estuviese determinada por varios genes, y no por un gen único (Gruner y Cabaret, 1988). La selección genética tendría, además, consecuencias económicas beneficiosas por la disminución de la contaminación de los pastos (Winton, 1990), que además reduciría la frecuencia de los tratamientos antihelmínticos, así como la resistencia a los mismos por parte de los nematodos (Barger, 1989).

Muchos investigadores han puesto de manifiesto la necesidad de encontrar algún marcador indirecto de resistencia para comprobar su grado de respuesta a las parasitosis (Winton, 1990, 1991; Hohenhaus y Outteridge, 1995). El tipo de hemoglobina, los antígenos de linfocitos ovinos (OLA) así como la capacidad de respuesta inmunitaria se han considerado como potenciales marcadores.

El tipo de hemoglobina que portaban los animales dio lugar a muchos estudios para comprobar la relación entre la receptividad a la hemoncosis y esta característica. Estudiando parámetros fisiopatológicos (hematocrito, concentración de hemoglobina, etc) y eliminación fecal de huevos del parásito en merinos con infestaciones naturales, se encontraron animales más receptivos a la enfermedad que portaban el tipo B, mientras que los animales con hemoglobina de tipo A sufrieron en menor medida la parasitosis (Allonby y Urquhart, 1976), mostrando, incluso, una mayor tendencia a la autocuración; los animales heterocigóticos AB presentaron un comportamiento intermedio. En otros estudios Altaif y Dargie (1978a y b) así como Preston y Allonby (1979b) comprobaron el mismo hecho, aunque en estos trabajos los autores plantearon la posibilidad de la existencia de algún otro marcador genético además del tipo de hemoglobina **per se**.

Estudios posteriores, sin embargo, no han mostrado ninguna relación entre el tipo de hemoglobina de los animales y la resistencia de los mismos a **H. contortus**, proponiendo una base genética distinta para la resistencia a la hemoncosis y no ligada al tipo de hemoglobina del hospedador (Kassai y col., 1990). Lo mismo fue sugerido por Luffau y col. (1990), quienes relacionaron la hemoglobina de tipo A en los ovinos a una mejor capacidad para superar la

anemia causada por **H. contortus** y no a una mayor resistencia frente a la infestación.

La capacidad de respuesta inmunitaria de los animales se ha empleado en ocasiones para averiguar el grado de resistencia a las enfermedades parasitarias. Se ha sugerido que el nivel de anticuerpos así como la subclase de inmunoglobulina presente -de forma sistémica o localizada- en el curso de las parasitaciones está bajo control genético tanto en ganado ovino (Gill, 1991, 1993a, 1994) como en vacuno (Gasbarre y col., 1990), y que influye de forma notable en la adquisición de resistencia. Además, la respuesta inflamatoria originada (eosinofilia, mastocitosis, etc) por diversos vermes gastrointestinales se ha relacionado con el grado de resistencia adquirida (Gill, 1991; Gill y col., 1991a; Hohenhaus y Outteridge, 1995), más aún cuando se ha demostrado que la resistencia genética a **H. contortus** se vio suprimida cuando los animales fueron tratados con un corticosteroide, y que este efecto se evidenció de forma notable en la respuesta inflamatoria local (Presson y col., 1988). Pritchard (1993) sugirió la posible relación entre la resistencia a las helmintosis gastrointestinales y la persistencia del antígeno en forma de inmunocomplejo en el tejido linfoide que recogía el drenaje proveniente de los lugares de asentamiento parasitario.

Se han encontrado asociaciones entre el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y la resistencia frente a infestaciones por nematodos en varias especies animales, incluídas ganado vacuno, porcino y ovino (in Schwaiger y col., 1995). En estudios realizados por Outteridge y col. (1985, 1986) se halló una aparente asociación entre los antígenos linfocitarios ovinos (OLA) denominados SY1 (1a+1b) y la menor eliminación fecal de huevos (animales clasificados como "de alta respuesta") de **T. colubriformis** en animales vacunados con larvas irradiadas, mientras que el antígeno denominado SY2 se asoció preferentemente con animales que eliminaban mayores cantidades de huevos ("de baja respuesta"). También se ha sugerido que el alelo DRB1, perteneciente al complejo principal de histocompatibilidad, guarde alguna relación con las menores eliminaciones fecales de huevos de **Te. circumcincta** en animales Scottish Blackface de 6 meses de edad, mientras que esta relación resultó difícil de establecer en animales más jóvenes (Schwaiger y col., 1995). Sin embargo esta asociación no ha podido ser demostrada en el caso de infestaciones con **H. contortus** (Cooper y col., 1989), aunque Luffau y col. (1990) no excluyen la posibilidad de que genes pertenecientes o cercanos al sistema OLA puedan afectar a la resistencia frente a **H. contortus**.

Otros sistemas de estudio se han llevado a cabo con el fin de demostrar alguna relación entre patrones de restricción de ADN (RFPL) y resistencia a helmintos, aunque aún no se han publicado resultados positivos en este sentido (Wendon, 1991). Hasta el momento los marcadores indirectos de resistencia a las tricostrongilidosis, particularmente a las hemoncosis, no son ampliamente utilizados de forma rutinaria en los programas de selección genética; sin embargo, en Nueva Zelanda y Australia se emplean algunos de estos marcadores indirectos (anticuerpos específicos, OLA, eosinófilos) para seleccionar animales resistentes (in Hohenhaus y Outteridge, 1995).

1.5.4. Infecciones/infestaciones concurrentes

La existencia de antigenicidad cruzada entre los nematodos tricostrongídeos más comunes ha sido demostrada (Chaarley y col., 1981; Anderson y col., 1989; Cox y col., 1990; Gamble y col., 1990; Cuquerella y col., 1994a), sin embargo, la influencia que ejercen las especies heterólogas sobre la resistencia a las infestaciones por **H. contortus** no está claramente establecida. Se ha comprobado que las infestaciones con **Te. circumcincta** producen un efecto negativo sobre el asentamiento de **H. contortus** en el abomaso (Blanchard y Wescott, 1985 y Dobson y Barnes, 1995). De forma general este efecto negativo ha sido atribuido a los cambios de pH producidos en el abomaso por **Te. circumcincta**, así como a otras alteraciones en el medio parasitario capaces de afectar a una instauración normal del parásito. Dichas alteraciones resultaron más evidentes especialmente en la ostertagiosis de reciente adquisición o coincidentes en el tiempo con la hemoncosis.

En experimentos realizados por Reinecke y col. (1979) se evidenció una protección parcial frente a la hemoncosis en ovejas que habían sido previamente infestadas con **T. axei**, mientras que las infestaciones previas con **Te. circumcincta** o **H. placei** no confirieron ninguna capacidad de protección cruzada a los animales. Quizás en este caso la duración de las infestaciones previas con **Te. circumcincta** no consiguió mantener los cambios necesarios en el abomaso capaces de disminuir la implantación de **H. contortus**.

La escasa o nula protección frente a la hemoncosis que confieren las infestaciones con **T. colubriformis** ha sido confirmada en numerosas ocasiones (Adams y col., 1990; Emery y col., 1992; Barnes y Dobson, 1993). Sin embargo, este verme sí resultó capaz de eliminar otros parásitos menos relacionados con él antigénicamente (**Nematodirus spathiger**) pero que compartían idéntica localización dentro del hospedador (Emery y col., 1993). Los autores plantearon la importancia de la expulsión no específica de vermes en la protección cruzada frente a nematodos heterólogos, la cual actuaría únicamente en el lugar de implantación del parásito que la desencadenó (intestino delgado en este caso), pero sin embargo sería incapaz de eliminar a los parásitos que se localizaran en el abomaso.

La resistencia genética a una determinada especie parasitaria confiere también algún grado de resistencia frente a infestaciones heterólogas, al menos en el caso de parásitos relacionados (Barger, 1984; Windon, 1990, 1991; Kassai y Sréter, 1992; Sréter y col., 1994). Además se ha demostrado una correlación importante entre los niveles de anticuerpos hallados en un número muy elevado de ovejas frente a cuatro especies de nematodos parásitos (Douch y col., 1995).

Algunas enfermedades parasitarias influyeron sobre la capacidad de resistencia de los animales a la hemoncosis. Las infestaciones previas con protozoos intestinales (coccidiosis) en animales destetados produjo un incremento en las eliminaciones fecales de huevos de tricostrongídeos (de la Fuente y col., 1993). Se ha comprobado, además, un acortamiento del periodo de prepatencia menor y un incremento en la patogenicidad de **H. contortus** cuando el ganado tripanotolerante sufría infecciones concurrentes con **Trypanosoma congolense** (Kaufmann y col., 1992). Sin embargo, no se comprobó ninguna asociación adversa en animales resistentes a la hemoncosis con enfermedades de carácter infeccioso como el pederio ovino (Woolaston, 1993).

1.5.5. Otros factores

En la adquisición de resistencia a la hemoncosis se ha sugerido la importancia de factores tales como la dosis recibida (Barger y col., 1985), la persistencia de estímulo antigénico (Barger, 1988; Pritchard, 1993) y el calendario de las infestaciones (Cuquerella y col., 1994).

Barger y col. (1985) evidenciaron que los animales que mayores dosis larvárias de **H. contortus** recibieron fueron los que finalmente lograron mayor resistencia a la infestación, siendo capaces de una mayor tasa de eliminación de parásitos adultos. Más tarde se ha comprobado la necesidad de la persistencia de una población de vermes (especialmente adultos) para mantener el grado de resistencia alcanzado frente a la hemoncosis durante el transcurso de infestaciones previas (Barger, 1988), planteando dudas sobre el beneficio real de los tratamientos antihelmínticos que eliminaban tanto parásitos como estímulo antigénico.

De igual modo, se comprobó que los animales adultos que menores eliminaciones fecales de huevos producían eran aquéllos que más veces se habían enfrentado a infestaciones previas con **H. contortus**, es decir los que soportaron durante más tiempo las infestaciones, y por tanto el estímulo antigénico que éstas suponían. Se observó que era necesario un periodo de **ca.** 4 meses sin contacto con el helminto, tras haber sufrido las infestaciones, paara garantizar una rspuesta más eficaz (Cuquerella y col. 1994b). Un aspecto de interés es la sugerencia de Pritchard (1993) sobre la necesidad de la presencia de inmunocomplejos (**vide supra**).

Por otra parte, se ha sugerido que los tratamientos antihelmínticos **per se** son capaces de alterar las funciones del sistema inmunitario ovino. Este hecho se estudió tanto con benzimidazolcarbamatos como con ivermectinas (Stankiewicz y col., 1994, 1995), llegando los autores a la conclusión de que ambos compuestos influían de forma negativa sobre la actividad blastogénica de linfocitos y sobre la respuesta secundaria de anticuerpos.

1.6. Caracterización de **H.contortus**. Aplicaciones a la inmunoprofilaxis e inmunodiagnóstico.

Tras los estudios pioneros de Neilson (1969) y Ozerol y Silverman (1969, 1970), se han llevado a cabo numerosos estudios para caracterizar los componentes, fundamentalmente proteicos, de **H.contortus**. Estos estudios, al igual que ocurre con otros helmintos, se han visto complicados al poseer los nematodos una gran cantidad de componentes de potencial antigenicidad que

pueden variar a lo largo de su ciclo biológico apareciendo como estadio-específicos (de Leeuw y Cornelissen, 1991; Wedrychowicz y col., 1994, Koyman y Eysker, 1995), y existir una elevada antigenicidad cruzada con miembros de la misma o diferente familia (Shamansky y col., 1989; Cox y col., 1990a; Cox 1992), circunstancias que dificultan de forma extraordinaria la búsqueda de antígenos inmunodiagnósticos o inmunoprotectores.

Los antígenos que más se han utilizado en estudios inmunológicos han sido aquéllos que presumiblemente tienen un mayor contacto con el hospedador. Este es el caso de los antígenos del tegumento y la cutícula o de antígenos de excreción y secreción producidos tanto en órganos especializados como en el tegumento parasitario (Lightowlers y Rickard, 1988). Las enzimas parasitarias (de defensa, proteolíticas) se han considerado importantes candidatos para establecer estrategias de protección frente a los parásitos (Knox y Jones, 1991). Todas estas sustancias pueden participar en procesos tales como penetración y alimentación en el hospedador, evasión de la defensa inmunitaria así como en procesos inmunopatológicos.

Se han realizado numerosos estudios sobre los antígenos de la cutícula y tegumento de **H. contortus** en diversas fases del ciclo biológico, adulto, L3 y L4 fundamentalmente (Cox y col., 1989, 1990b; Rhoads y Fetterer, 1990, 1994; Ashman y col., 1995), entre ellos una glicoproteína (70-90 kDa) que podría intervenir en la evasión de la respuesta inmunitaria (Ashman y col., 1995); el colágeno no parece tener un gran interés por tratarse de una molécula muy conservada filogenéticamente, con afinidades incluso con algunos de vertebrados (Shamansky y col., 1989; Cox y col., 1990a; Cox, 1992).

El último grupo de antígenos que ha atraído la atención de los investigadores ha sido el de antígenos solubles y productos de excreción/secreción. Tras los trabajos iniciales (solubles, excreción/secreción, líquido de desenvainamiento; Neilson, 1969; Ozerol y Silverman, 1989; 1970; Clarke y Slocombe, 1984; Neilson y Van de Walle, 1987) se han obtenido más recientemente resultados prometedores tanto con antígenos solubles (Cuquerella y col., 1993) como con productos de excreción/secreción (Schallig y col., 1994b). Entre estos productos hay que destacar a las cisteína proteasas (Karanu y col., 1993; Knox y col., 1993).

1.6.1. Inmunización

Que la inmunización frente a las infestaciones por **H. contortus** es posible queda demostrado por la constatación de que las infestaciones continuas de los animales con varias dosis larvarias seguidas de un reto provoca un grado de inmunidad aceptable con considerables disminuciones en las cargas parasitarias, tanto en infestaciones con **H. contortus** (Christie y col., 1978) como en otros tricostrongílidos (Douch, 1988). Una evidencia de este hecho, en condiciones naturales, es la suministrada por la disminución de la intensidad de las infestaciones en animales adultos.

Desde el éxito obtenido con la vacuna basada en larvas irradiadas de **Dictyocaulus viviparus** en el ganado vacuno, se realizaron intensas investigaciones en el caso de los nematodos gastrointestinales de rumiantes. La elección de la dosis de irradiación pareció ser transcendental en la preparación de las vacunas. siendo las dosis más adecuadas las comprendidas entre 40 y 60 krad (Smith y Christie, 1978). Asimismo, resultaba conveniente la utilización de dos dosis larvarias para producir el efecto deseado. En otros sistemas parásito-hospedador se demostró, de igual forma, la importancia de la dosis larvaria empleada en la vacuna, que debía superar una cantidad límite para tener éxito (Windon y col., 1984; Seaton y col., 1989). En el caso de **H. contortus**, la dosis requerida en la mayoría de los ensayos realizados fue de 10000 L3 (x 2 dosis). Se ha sugerido que el modo de acción de estas vacunas sería la diferente conformación y presentación de antígenos parasitarios que determinaría el incremento de inmunogenicidad de la vacuna (Wales y Kusel, 1992).

A pesar de los éxitos obtenidos con animales adultos, los ensayos de vacunación no funcionaban de igual forma en animales que contaban con pocos meses de edad (Urquhart y col., 1966; López y Urquhart, 1967) desarrollándose una mayor respuesta de forma paralela a su crecimiento (Smith y Angus, 1980). Quizás este factor, junto con los problemas asociados a la aplicación de la vacuna en condiciones de campo (cantidad de larvas necesarias, transporte, viabilidad y conservación) han hecho desistir a los investigadores en sus intentos y dirigir sus esfuerzos hacia antígenos parasitarios determinados (Emery y col., 1993).

Tanto mezclas proteicas como antígenos parasitarios purificados de forma parcial han sido ampliamente utilizados en la formulación de vacunas. A pesar del frecuente empleo de larvas como fuente de antígenos protectores (Neilson y van de Walle, 1987; Boisvenue y col., 1991; Turnbull y col., 1992), su capacidad inmunógena ha sido discutida cuando se relacionó con la respuesta provocada con un sonicado de vermes adultos (Adams, 1989).

El empleo de fracciones proteicas del parásito se ha resuelto en diferentes grados de protección. Los ensayos realizados con proteínas cuticulares larvarias de tipo colágeno (Boisvenue y col., 1991), así como con antígenos de superficie larvarios (Turnbull y col., 1992) no tuvieron éxito. Sin embargo, Neilson y Van de Walle (1987) lograron una reducción de la población parasitaria adulta del 59% al emplear una fracción larvaria mayor de 30 kDa en animales menores de 6 meses en una raza de respuesta precoz (Florida Native).

Una aproximación, desarrollada en los últimos años por varios grupos de investigación, es la utilización de diferentes antígenos procedentes del tracto intestinal parasitario (Munn y col., 1987; Jasmer y McGuire, 1991, 1996; Smith y col., 1994). A pesar de que algunos de estos antígenos estén presentes en el intestino de otros parásitos relacionados (Jasmer y McGuire, 1991), su utilización en ensayos vacunales frente a especies que no se alimenten de sangre del hospedador no parece adecuada, puesto que los anticuerpos no llegarían a su destino.

Los resultados más espectaculares se han logrado con la glicoproteína de **H. contortus** H11 (Munn y col., 1987). En las numerosas pruebas llevadas a cabo con esta fracción parasitaria se ha demostrado su efectividad cuando se estudian algunos parámetros parasitarios. Cabe destacar la drástica reducción de la eliminación fecal de huevos, así como la mayor susceptibilidad de las hembras del helminto a la vacuna. Sin embargo, en ningún caso aparecen señaladas las poblaciones de parásitos inmaduros, y dado el escaso tiempo de duración de las infestaciones (35 días), resultaría interesante comprobar si el efecto se debe únicamente a una detención del desarrollo parasitario y no a la eliminación efectiva del helminto.

La acción protectora de la vacuna sobre la pérdida de eritrocitos se ha comprobado en ovejas de raza Clun Forest (Tavernor y col., 1992b). No obstante, esta consecuencia no resulta tan marcada en corderos de la misma raza (Munn y

col., 1993b) o bien en ovinos jóvenes de raza Dorset (Tavernor y col., 1992a; Smith y col., 1993; Munn y col., 1993b), no habiendo sido comprobado el valor hematocrito en corderos merinos (ver Munn y col., 1993a). Tampoco se ha demostrado una sustancial transferencia de protección de madres gestantes hacia sus corderos por medio del calostro, a pesar del mayor nivel de anticuerpos séricos anti-H11 detectados (Andrews y col., 1995). La vía de administración de la vacuna (intramuscular o subcutánea) ejerce una considerable influencia sobre el isotipo de IgG predominante en la respuesta y quizás fuese conveniente reconsiderar la formulación así como la vía de administración (Newton y col., 1995).

En todos los ensayos vacunales mencionados hasta el momento ha sido empleado el adyuvante de Freund (completo e incompleto). Se ha postulado el posible papel de este adyuvante en el incremento de receptividad a la hemoncosis (Adams, 1989). No obstante, el caso contrario ha sido a su vez descrito por Bautista-Garfias y col. (1991), evidenciando reducciones inespecíficas en la población parasitaria entre un 30 y un 56% en corderos de 6 meses que sufrieron infestaciones experimentales con 10000 L3 de **H. contortus**.

El éxito conseguido con ciertas enzimas parasitarias en ensayos de vacunación tuvo como consecuencia el que numerosos investigadores siguieran por esta vía. La capacidad de la Glutathione-S-transferasa (GST) de **Schistosoma mansoni** para producir protección frente a infestaciones por el parásito es bien conocida, encontrándose también esta capacidad de protección de la enzima en otros Digenea como **Fasciola hepatica** (ver Brophy y Pritchard, 1992). A pesar de que la cantidad de esta enzima producida por los tricostrongílidos es bastante inferior se han realizado valoraciones de su potencial capacidad protectora en el caso de L3 de **H. contortus**, aunque sin éxito (Sharp y col., 1991).

1.6.2. Diagnóstico inmunológico de la hemoncosis ovina

El diagnóstico de la hemoncosis ovina, además de en la epidemiología y clínica de la parasitosis, se ha basado esencialmente en la coprología y coprocultivo. Además de sus limitaciones (prepatencia, cuadros agudos) requiere

personal especializado y tiempo para completar el desarrollo larvario (L3), por lo que otros tipos de diagnóstico serían de interés.

La detección de componentes parasitarios en los animales infestados sería de evidente valor, sin embargo, los ensayos realizados hasta el momento para determinar tanto los antígenos circulantes en animales infestados (Petit y col., 1981) como los presentes en la materia fecal de sus hospedadores (Ellis y col., 1993) no ha tenido éxito. Los estudios para determinar la presencia de ADN parasitario no parecen de utilidad práctica por su coste económico (Roos y Grant, 1993; Christensen y col., 1994). Por todo ello, el interés fundamental se ha centrado en el desarrollo de diagnósticos inmunológicos indirectos.

Desgraciadamente, los métodos diagnósticos desarrollados han adolecido de falta de sensibilidad -siendo útiles en ciertos casos sólo en algunas razas ovinas- y, especialmente, una extremada falta de especificidad. Este hecho ha sido relacionado con la presencia de proteínas con una antigenicidad común entre nematodos emparentados, como es el caso de **H. contortus** y **Te. circumcincta** (Anderson, y col., 1989), proteínas muy conservadas genéticamente entre nematodos diversos (Shamansky y col., 1989; Cox y col., 1990a) o bien la presencia de fosforilcolina en los extractos parasitarios, dando lugar todo ello a la presencia de reacciones cruzadas entre los diversos nematodos (Hendriks y col., 1990; Péry y col., 1974; van Leeuwen y col., 1992). Además estos métodos de diagnóstico pueden ser complicados por la existencia de inmunoglobulinas del hospedador en los extractos antigénicos de adultos de **H. contortus** (Murray y Smith, 1994).

La complejidad antigénica hace necesaria la simplificación así como el estudio individual de antígenos determinados para poder aclarar su papel sobre el sistema inmune (Charley-Poulain y col., 1984), del mismo modo que en otros trichostrongyloideos del ganado ovino (p.e. **T. colubriformis**: Savin y col., 1990; Dopheide y col., 1991- **Te. circumcincta**: McGillivray y col., 1989).

Schallig y col. (1995b) encontraron ligeramente incrementada la sensibilidad y especificidad del método ELISA cuando emplearon antígenos de excreción/secreción de adultos de **H. contortus** respecto a los extractos solubles parasitarios, pero de mayor interés han resultado los estudios realizados sobre antígenos individuales. Mediante separación electroforética de los antígenos de **H. contortus** se han evidenciado proteínas parasitarias que fueron

reconocidas por ovejas infestadas, mientras las ovejas testigo no mostraron el mismo patrón de reconocimiento. Los resultados se han obtenido en estudios puntuales con extractos larvarios (Hendrikx y col., 1990), así como con antígenos de adultos en estudios seriados (Cuquerella y col., 1993; Schallig y col. 1994b). Los antígenos de 24 kDa y de 55-60 kDa señalados por Schallig y col. (1994b, 1995a) o Takáts y col. (1995) se han considerado como específicos y buenos indicadores de la infestación. Asimismo, los antígenos de peso molecular 25-26 kDa indicados por Cuquerella y col. (1993) han demostrado ser específicos además de poder realizar diagnósticos de hemoncosis ovina durante el periodo prepatente de la infestación así como en corderos jóvenes, lo que les señalan como buenos aspirantes para su uso en un diagnóstico serológico indirecto (Cuquerella y col., 1993).

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Material biológico

2.1.1.a. Corderos

2.1.1.a.1. Grupo de corderos donadores

En el mantenimiento de "cepas" parasitarias y la obtención de material antigénico se emplearon 20 corderos donadores (444, 445, 446, 447, 448, 449, 459, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, A, B, C, X, Y, Z). La mayor parte de los animales utilizados fue de raza Churra (11 animales); el resto, de raza Manchega (8 animales). Se empleó también un cordero Churra x Romanov. En la medida de lo posible se optó por trabajar con machos (16 machos y 4 hembras) para poder incrementar la dosis infestante. Los animales provenían de fincas situadas en Valladolid y Albacete y fueron adquiridos cuando tenían aproximadamente 1,5-2,5 meses de edad. A su llegada a las instalaciones se realizaron análisis coprológicos individuales, en los que se evidenciaron en todos los casos cargas moderadas de ooquistes de coccidios, resultando negativos a otros parásitos (excepto el animal nº 7 que eliminó 15 hpg de **Nematodirus** spp. y el cordero B que eliminó 15 hpg de **Strongyloides** spp.). Posteriormente se procedió al tratamiento con Amprolio durante cinco días (100 mg/Kg) y a la desparasitación con Tiabendazol (88 mg/Kg) dos días. Antes de su infestación se permitió un periodo de adaptación comprendido entre 15 y 65 días, según el caso. Los corderos se mantuvieron en las instalaciones del Departamento de Patología Animal I hasta su sacrificio.

2.1.1.a.2. Grupo de corderos experimentales

Para el estudio de la respuesta de corderos a las infestaciones por **H. contortus** se emplearon cuatro razas ovinas españolas. Las razas representativas elegidas por nosotros fueron Castellana, Churra, Merina y Manchega, tipos raciales que en su conjunto agrupan **ca.** 50% del censo ovino español. De cada raza se escogieron catorce animales (siete machos que fueron posteriormente vasectomizados y siete hembras), con un total de 56 corderos (V1-V56) de aproximadamente dos meses de edad. Los animales fueron trasladados y mantenidos en las instalaciones de la finca de Lucio Mozo (Villanubla, Valladolid). Los animales testigos e infestados permanecieron en dos apartados dentro del mismo recinto, separados por un pasillo de 2 m de anchura, teniendo cada apartado alrededor de 25 m². Las distintas razas procedían de diferentes explotaciones:

Castellana.- Lucio Mozo (Valladolid)

Churra.- Servicio Territorial de Agricultura "La Santa Espina", Castromonte
(Valladolid)

Merina.- Agrícola Cobacha, S.A. (Badajoz)

Manchega.- Asociación Martaña S.A., Finca Santa Marta, La Roda, (Albacete)

Cuando los animales llegaron a la finca se procedió a la realización de análisis coprológicos individuales, los cuales resultaron negativos a trichostrongiloideos, excepto tres animales de raza Merina (nº 31, 35 y 36). Dichos corderos eliminaban 15 huevos por gramo de heces y, posteriormente, mediante coprocultivo, se comprobó que correspondían al género **Teladorsagia**. Además los animales mostraron cargas moderadas de ooquistes de coccidios, siendo las mayores cargas correspondientes a animales de raza Churra. Todos los animales fueron tratados con Amprolio (100 mg/Kg) durante cinco días y desparasitados con Tiabendazol (88 mg/kg) dos días. Después del tratamiento, los animales se mantuvieron libres de trichostrongiloideos durante ocho meses en dichas instalaciones. Durante este periodo un animal de raza Manchega murió como consecuencia de una reticulitis traumática, por lo que el grupo de dicha raza quedó reducido a 13 animales.

2.1.1.b. Animales de campo

En el muestreo realizado para comprobar la validez diagnóstica de los antígenos identificados y aislados por nosotros, se escogieron diferentes explotaciones de la Comunidad de Madrid. Los animales estudiados fueron hembras de 1-3 años de edad y que, mayoritariamente, pertenecían a la raza denominada Rubia del Molar. Se muestrearon un total de 65 ovejas pertenecientes a 7 explotaciones:

San Sebastián de los Reyes.- 10 animales

Torrelaguna.- 8 animales

El Espartal.- 8 animales

El Espartal (bis).- 4 animales

Talamanca del Jarama.- 9 animales

El Molar.- 20 animales

Todos los animales salían a pastar en el momento del muestreo. Las hembras de estas explotaciones pertenecían a una Asociación de Defensa Sanitaria, y eran desparasitadas una vez al año con Albendazol. Además cada año eran revacunadas frente a Brucelosis, y en algunas ocasiones también se las vacunaba frente a mamitis.

Además se tomaron muestras de 4 ovejas de raza Segureña procedentes de la comunidad de Murcia, y 2 ovejas de raza Merina procedentes de León.

2.1.1.c. Conejos

Para la obtención de sueros hiperinmunes frente a antígenos de diferentes estadios de tricostrongiloideos se emplearon seis conejos hembras de raza Nueva Zelanda x Gigante de California (C1, C3, C4, C6, C7, C8). Los animales provenían de la Escuela de Ingenieros Agrónomos (Universidad Politécnica de Madrid) y fueron adquiridos con dos meses de edad. Se trataron cada treinta días con ivermectina (Ivomec, MSD-AGVET) (0,02 ml/Kg). Además se les realizaron análisis coprológicos, resultando todos ellos negativos a helmintos. Los animales fueron

alojados en las instalaciones de nuestro Departamento, donde permanecieron hasta su sacrificio.

2.1.1.d. Material parasitario

Se utilizaron tres especies parasitarias pertenecientes a la familia Trichostrongylidae: **Haemonchus contortus**, **Teladorsagia circumcincta** (dos "cepas") y **Trichostrongylus colubriformis**. Se emplearon L-3 en las infestaciones de animales experimentales y donadores y tanto adultos como L-3 para la obtención de material antigénico.

Las larvas infestantes de **H. contortus** fueron cedidas por MSD-AGVET-España. Se emplearon dos "cepas" de **Te. circumcincta**, la primera cedida por el Dr. J. Uriarte (ITEA, Zaragoza) y la segunda por el Prof. J.L. Duncan (Veterinary School, Glasgow, Escocia). Además se utilizó un aislado de **T. colubriformis** también procedente de Glasgow.

2.1.2. Material de laboratorio

2.1.2.a. Material general

- Agujas cono Luer (9 x 25 mm y 0,5 x 16 mm) (Microlance, Becton Dickinson)
- Botellas de vidrio de 250, 500 y 1000 ml (Pyrex)
- Cubetas de polietileno
- Contenedor de plástico de polipropileno tipo Universal de 25 ml
- Cubreobjetos
- Chupetes de látex
- Espátulas
- Gradillas metálicas en "z" para tubos y eppendorf
- Guantes de plástico y de látex de un solo uso
- Hojas de bisturí del número 24
- Jeringas cono Luer de 2, 5 y 10 ml (lco steril)

- Jeringas cono Luer de cristal esterilizable de 5ml (Cornwal)
- Matraces de vidrio de 100, 250, 500, 1000 y 2000 ml (Pyrex)
- Papel de filtro
- Pinzas
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml
- Pipetas Pasteur de 150 y 230 mm
- Placas de Petri de 9 cm de diámetro
- Portaobjetos
- Probetas de 50, 100, 250 y 1000 ml de capacidad
- Punzones
- Duquesas de polietileno
- Tijeras
- Tubos eppendorf de polipropileno de 1 y 1,5 ml
- Tubos de vidrio de 5 ml
- Tubos de vidrio de 10 ml para centrífuga (Trimex)
- Tubos de 15 y 50 ml de polipropileno para centrífuga (Corning , TPP
® y Nunc)

2.1.2.b. Material para análisis coprológicos

- Aparato Baermann
- Bolsas de recogida de heces
- Cámaras de McMaster
- Copas de sedimentación
- Jaulas metabólicas de hierro galvanizado
- Mallas de tamizado de 500 y 150 μ m de luz y cubeta fondo de mallas
- Morteros y mazos

2.1.2.c. Material para caracterización antigénica

- Criotubos de plástico de polipropileno de 1,8 ml (Nunc)
- Cubetas de plástico de poliestireno de 1 ml para refractometría
- Cubetas de cuarzo de 1 ml para espectrofotometría (Hellma ®)
- Homogeneizador de vidrio de 7 ml (Pobel)

- Llaves de tres vías, así como adaptadores "macho" y "hembra" de polipropileno para cono Luer (Bio-Rad)
- Tubos de diálisis de celulosa (16 mm de diámetro) con corte de peso molecular 12-19 kDa (Visking ®, Serva)
- Tubos de silicona de 0,8 mm de diámetro interno (Bio-Rad)
- Columnas para cromatografía de 1 x 30 y 1,5 x 90 cm (Bio-Rad)
- Cristales de electroforesis de 10 x 10 cm, así como separadores de 1 mm de grosor (Lagoplast)
- Cristales, placas de alúmina y cubetas de electroforesis (Mighty Small™, Hoefer)
- Cubetas verticales de electroforesis de 12,5 x 12,5 cm (Lagoplast)
- Cubeta Trans-Blot Cell, con cartucho de transferencia y serpentín (nº 170 3911), (Bio-Rad)

2.1.2.d. Material para ensayos inmunológicos

- Agujas para extracción de sangre (9 x 25 mm, Vacutainer y Venoject)
- Centricon 10 y 30 (Millipore)
- Esponjas de 15 x 20 cm (Trans-blot)
- Membranas de transferencia Immobilon P y Nitrocelulosa (0,4 µm Millipore)
- Papel de plástico y papel de aluminio
- Pipetas automáticas P20, P200, P100 (Gilson) y P10 (Biohit)
- Pipetas multicanal de 8 puntas P50 y P250 (Titertek ®)
- Placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano (Nunc)
- Puntas de pipeta de plástico de polipropileno de 250 y 1000 µl
- Tubos de extracción de sangre con vacío de 10 ml (Vacutainer ® y Venoject ®)

2.1.2.e. Reactivos generales

- Acetona (Panreac)
- Acetato sódico (Probus)
- Ac. Acético glacial (Panreac)
- Ac. Cítrico (Merck)

- Ac.Clorhídrico (Panreac)
- Bicarbonato sódico (Panreac)
- Carbonato sódico anhidro (Panreac)
- Cloroformo (Mallinkrodt)
- Cloruro de magnesio seis veces hidratado (Probus)
- Cloruro potásico (Panreac)
- Cloruro sódico (Quimon)
- Dimetilformamida (Probus)
- Etanol (Panreac)
- Fosfato disódico (Panreac)
- Fosfato potásico (Panreac)
- Glicerina (Merck)
- Glicina (Panreac)
- Hidróxido sódico (Panreac)
- Leche en polvo (Molico Sveltesse, Nestlé)
- Metanol (Panreac)
- Negro amido (Merck)
- Pepsina (Merck)
- Peróxido de hidrógeno 30 % (Foret)
- Persulfato amónico (Merck)
- Ponceau S, sal sódica (Sigma)
- 2-Propanol (Merck)
- Sacarosa (Panreac)
- Sepiolita
- Sulfato amónico (Merck)
- Sulfato de zinc siete veces hidratado (Panreac)
- N, N, N', N - Tetrametiletileno diamina, Temed (Merck)
- Tween 20 (Merck)
- Zotal ®

2.1.2.f. Reactivos utilizados en el aislamiento y caracterización de antígenos

- Ac. Etilenodiaminotetraacético (Sigma)
- Acrilamida, 95% de pureza (TDI)
- Ac. ortofosfórico al 85% (Panreac)
- Azul de Bromofenol (Sigma)

- Azul de Coomassie G 250 (Merck)
- Azul de Coomassie R 250 (Merck)
- 1-Cloro-2,4-dinitrobenceno (Sigma)
- DEAE-Sephacel (Sigma)
- Dodecil sulfato sódico (Merck)
- Fenil metil sulfonil fluoruro (Merck)
- Glutation reducida (Sigma)
- Kit de detección de glicoproteínas (Boehringer Mannheim)
- Kit de tinción de plata (Bio-Rad)
- Marcadores de bajo peso molecular (Pharmacia)
- Marcadores de peso molecular (MW-GF-200 kit, Sigma)
- 2-Mercaptoetanol (Merck)
- N-Metil bis(acrilamida) (Merck)
- Sephacryl S-200 (Pharmacia)
- S-hexilglutation-epoxi-agarosa (Sigma)
- Sulfobroftaleína-S-glutation (CNBr-agarosa) (Sigma)
- Thimerosal (Merthiolate ®, Sigma)
- Tioglicolato sódico (Sigma)
- Na-p-Tosil-L-Lisina Cloro Metil Ketona (Boehringer Mannheim)
- N-Tosil-L-fenilalanina Cloro Metil Ketona (Boehringer Mannheim)
- Tris (Hidroximetil)-aminoetano (Merck)

2.1.2.g. Reactivos para ensayos inmunológicos

- Acido 2, 2' - Azinobis (3-etilbenzotiazolinsulfónico) (Boehringer Mannheim)
- Albúmina sérica bovina (Sigma)
- Adyuvantes completo e incompleto de Freund (DIFCO)
- 4-Cloro-1-Naftol (Bio-Rad)
- 1,4 p-Nitrofenil fosfato (Boehringer Mannheim)
- Anticuerpo policlonal aislado mediante afinidad frente a un péptido de 24 Kda de **H. contortus** (cedido por el Dr. H.D.F.H. Schallig)
- Anti-IgA bovina obtenida en conejo (RAB/sIgA, Nordic)
- Anti IgG de oveja (H+L) obtenida en conejo y aislada mediante afinidad marcada con fosfatasa alcalina (nº control 72795A y 74407, Bio-Rad)

- Anti IgG de oveja (H+L) obtenida en conejo y aislada mediante afinidad marcada con peroxidasa (nº control 26206, Bio-Rad)
- Anti IgG de oveja (molécula completa) obtenida en asno y aislada mediante afinidad marcada con peroxidasa (lotes 014H-8995, 40H 8826, 042H8808, 102H-8858, Sigma)
- Anti IgG de conejo obtenida en cabra marcada con peroxidasa (nº control 70516, Bio-Rad)
- Anti IgG₁ de oveja obtenida en conejo (cedida por el Dr. H.D.F.H. Schallig, Universidad de Utrech, Holanda)
- Anti-IgG₁ de raton obtenida en conejo marcada con peroxidasa (SER 103P, lote 0294, Serotec)
- Anti-IgG₂ bovina/ovina obtenida de líquido de ascitis de ratón (MCA 626, lote 0395, Serotec)
- Anti-IgM bovina obtenida en conejo (RAB/IgM, Nordic)

2.1.2.g.a. Sueros

Para el seguimiento del aislamiento de antígenos diagnósticos se utilizaron sueros de 11 corderos, libres de infestación parasitaria, cedidos por el Dr. J.M. Troncoso y procedentes de Tarancón (Cuenca).

Se emplearon además los sueros de 30 animales de raza Texel cedidos por el Dr. H.D.F.H. Schallig (Universidad de Utrecht, Holanda), 10 de ellos libres de infestación y 20 infestados con **H. contortus**.

Como testigos en el seguimiento de la purificación de antígenos se emplearon sueros de 5 animales manchegos de aproximadamente 6 meses de edad, empleados anteriormente en otros estudios, que habían sufrido dos infestaciones (2500+5000 L-3) con **H. contortus** (Cuquerella Ayensa, 1992).

2.1.2.h. Aparatos utilizados

- Agitador orbital (SBS)
- Agitador vertical (Immunetics)

- Agitadores magnéticos (A-O5 SBS y Agimatic Selecta)
- Anillo micrométrico (Nikon)
- Balanza analítica monoplato (PE 2000 Mettler)
- Balanza de precisión (AJ 150 Mettler)
- Baño termostático (Mod. Unitronic 320 OR, Selecta)
- Cabina de flujo laminar vertical (Teistar, AV-100)
- Centrífuga preparativa refrigerada (Mod. Rc-5B, Sorvall ®) con rotor JA20
- Centrífugas de mesa (Mod. Combifuge, Heraeus; mod. Cetronic, Selecta y mod. Tornax Orto)
- Centrífuga de mesa refrigerada (Mod. 3 k 10, Sigma)
- Colector de fracciones (Retriever II, Iberlabo)
- Estereomicroscopio (0,66-4 x, Nikon)
- Espectrofotómetro Hitachi U-1100 (Visible-UV)
- Fuentes de alimentación de electroforesis (Mod. EC-105, EC-Apparatus Corporation y mod. ET 22, Consort)
- Fuente para transferencia Trans-Blot de voltaje constante (Bio-Rad, Mod. 200/2.0)
- Lector de ELISA (EAR 400)
- Microscopio Nikon (Alphaphot YS)

2.2 METODOS

2.2.1. Animales de experimentación

2.2.1.a. Condiciones de alojamiento y alimentación de los animales

2.2.1.a.1. Corderos

a) Corderos donadores.- Los 20 corderos utilizados como donadores de material parasitario fueron adquiridos con una edad aproximada entre 1,5 y 2,5 meses. A su llegada a las instalaciones del Departamento de Patología Animal I se les sometió

a tratamiento antihelmíntico, para después ser infestados. Estos animales se mantuvieron al principio en cama de paja, que era cambiada una vez por semana y desinfectado el local con Zotal ®. Cuando se infestaron, en unos casos permanecieron en estas condiciones y en otros fueron trasladados a jaulas metabólicas, que también eran limpiadas una vez por semana con Zotal. La alimentación consistió en paja y agua **ad libitum**, además de recibir pienso de cebo para corderos (Gallina Blanca, Purina) y bloques salinos.

b) Corderos experimentales.- Los 56 animales pertenecientes a cuatro razas ovinas autóctonas españolas fueron adquiridos con dos meses de edad y, después del tratamiento antihelmíntico, permanecieron durante ocho meses en las instalaciones en condiciones que impedían las infestaciones por helmintos hasta el comienzo del experimento, comprobado mediante análisis coprológicos periódicos. La cama era de paja y se cambiaba una vez por semana, limpiando el suelo con Zotal. Los animales se alimentaron con paja y agua **ad libitum** y se les administró en un principio pienso de cebo de corderos (Covana Nanta) para con posterioridad pasar a un pienso de mantenimiento de ovejas (Covana Nanta). Además se les suministró bloques salinos durante toda la permanencia en la finca. Estas medidas de higiene y alimentación se mantuvieron a lo largo de toda la experimentación.

2.2.1.a.2. Conejos

Los conejos utilizados en la obtención de sueros hiperinmunes se mantuvieron desde los dos meses hasta los diez meses de edad en las instalaciones de nuestro Departamento. Se alimentaron con agua y pienso comercial (Piensos Mejía, Toledo) **ad libitum**.

2.2.1.b. Medidas higiénico-sanitarias

a) Corderos donadores

Como se ha mencionado anteriormente, los corderos recibieron un tratamiento antiparasitario a su llegada a nuestras instalaciones (Amprolio 100 mg/kg 5 días y Tiabendazol 88 mg/Kg 2 días).

b) Corderos experimentales

Además de los tratamientos antiparasitarios que se tratarán con más detalle en un capítulo posterior los animales recibieron otros tratamientos. En el momento de llegada de los corderos a la finca de Valladolid, se les aplicó un anillo de goma en la cola para su amputación. A los 5 meses de edad los machos fueron vasectomizados y las hembras recibieron a los 6 meses PG F₂ α .

c) Conejos

A los tres meses de edad se observaron signos respiratorios (estornudos y descarga nasal) y se les aplicó un tratamiento con Oxitetraciclina pura (DICASA) disuelta en agua de bebida (0,1 g/l 15 días).

2.2.1.c. Diseño experimental

2.2.1.c.1. Infestaciones de corderos donadores

Los corderos donadores fueron infestados con tres especies parásitas del tracto gastrointestinal ovino, **H. contortus** (8 animales), **Te. circumcincta** (8 animales) y **T. colubriformis** (4 animales), con el fin de obtener material antigénico así como de mantener las "cepas" parasitarias.

Salvo las primeras infestaciones de **H. contortus** ensayadas (animales 459 y 448) la dosis utilizada en el resto de los casos fue de 350 L-3/Kg de peso vivo.

En el siguiente cuadro se muestran los datos pormenorizados de los ensayos: peso, edad y dosis recibida el día de la infestación, así como raza y sexo de los animales. (Nótese que algunos animales fueron infestados en más de una ocasión).

a) Animales infestados con **H. contortus**

Animal	Edad	Peso	Dosis	Sexo	Raza
459	2 m	16 Kg	1900 L-3	m	Ch x Rom.
459 bis	3 m	nd	4500 L-3	"	"
448	3 m	nd	4500 L-3	m	Churra
444	4,5 m	30 Kg	10500 L-3	m	Manchega
446	2 m	20 Kg	7000 L-3	m	Churra
1	2 m	14,5 Kg	5075 L-3	h	Churra
5	2,5 m	14,5 Kg	5075 L-3	m	Churra
A	3,5 m	29 Kg	10150 L-3	m	Manchega
Y	3 m	21 Kg	7350 L-3	m	Manchega

b) Animales infestados con **Te. circumcincta** (Los 4 primeros se infestaron con la cepa cedida por el Dr. Uriarte, mientras que los 4 últimos fueron infestados con la cepa procedente de Glasgow)

Animal	Edad	Peso	Dosis	Sexo	Raza
445	2 m	14 Kg	1400 L-3	m	Manchega
445 bis	4 m	nd	3500 L-3	"	"
445 bis	4,5 m	nd	13233 L-3	"	"
447	2 m	20 Kg	5000 L-3 x 5	m	Churra
449	2 m	nd	5000 L-3 x 5	m	Churra
2	2 m	13,5 Kg	500 L-3 x 15	h	Churra
4	3,5 m	nd	12500 L-3 x 2	m	Churra
7	2,5 m	19 Kg	25000 L-3	m	Churra
B	3,5 m	25 Kg	24000 L-3	m	Manchega
Z	2,5 m	18 Kg	17280 L-3	m	Manchega

c) Animales infestados con **T. colubriformis**

Animal	Edad	Peso	Dosis	Sexo	Raza
3	2 m	17 Kg	35000 L-3	h	Churra
6	2,5 m	14 Kg	40000 L-3	h	Churra
6 bis	5 m	nd	60000 L-3	"	"
C	3,5 m	25 Kg	60000 L-3	m	Manchega
X	2,5 m	19 Kg	45600 L-3	m	Manchega

Las L-3 empleadas en las infestaciones fueron almacenadas hasta su utilización a 4 °C, durante periodos que oscilaban entre 1 y 3 meses, aunque el tiempo de almacenamiento fue de 5 meses en la última infestación con cada especie (animales X, Y y Z).

En todos los animales se procedió a la toma de muestras (heces y sangre) 2 veces por semana para realizar análisis coprológicos y recogida de sueros para posteriores análisis inmunológicos.

2.2.1.c.2. Infestaciones con **H. contortus** de cuatro razas ovinas españolas

Como ya hemos mencionado anteriormente, se escogieron las razas Castellana, Churra, Merina y Manchega, que representaban ca. del 50% del censo nacional ovino. Los animales de cada raza se distribuyeron al azar en tres grupos que fueron sometidos a diferentes tratamientos experimentales ; cada uno de ellos contenía igual número de machos que de hembras.

Diez días antes de la infestación se realizó un tratamiento antihelmíntico (88 mg/Kg Tiabendazol, 2 días). El grupo denominado **2** recibió una primera infestación y más tarde una dosis de prueba. El grupo **1** recibió únicamente la dosis de prueba, mientras que el grupo **0** permaneció sin infestar durante todo el periodo experimental. La primera infestación se mantuvo durante 80 días terminando con un tratamiento con 88 mg/Kg Tiabendazol, 3 días. Quince días más tarde, se les administró a los animales, por vía oral, la dosis de prueba y finalmente, a los 50 días fueron sacrificados. El diseño experimental se muestra a continuación.

Grupo 2

Tto	10 días		80 días	Tto	15 días		50 días	
	-----	Infest.	-----		-----	Dosis P.	-----	Sacrificio

Grupo 1

	90 días		15 días		50 días	
Tto	-----	Tto	-----	Dosis P.	-----	Sacrificio

Grupo 0

	90 días		65 días	
Tto	-----	Tto	-----	Sacrificio

Para la primera infestación se utilizó una dosis de **ca.** 200 L-3/Kg p.v., mientras que la dosis de prueba fue de 400 L-3/Kg p.v.. A continuación se muestra la distribución de animales junto con las dosis infestantes recibidas en cada caso. El número corresponde a los grupos según los tratamientos experimentales recibidos; asimismo las letras corresponden a las iniciales de cada raza (**C.**- Castellana, **CH.**- Churra, **Me.**- Merina y **Ma.**- Manchega). Además se señala el sexo de cada animal.

El nº de L-3 administradas fue variable debido, fundamentalmente a dos razones: la diferencia de peso entre machos y hembras y la diferencia de peso entre las distintas razas.

2.2.1.c.3. Inoculación de antígenos a los conejos

Para la obtención de sueros hiperinmunes utilizamos 6 conejos hembra a los que se inoculó antígeno procedente de dos estadios parasitarios, L-3 y adultos, de **H. contortus**, **Te. circumcincta** y **T. colubriformis**. Se escogió el adyuvante completo de Freund (ACF) para incrementar la respuesta.

A los cinco meses de edad se les inoculó intramuscularmente por primera vez con 500 µg del antígeno correspondiente junto con ACF. A los 15 días se repitió la inoculación, esta vez con adyuvante incompleto de Freund (AIF). Dos semanas más tarde, se les inoculó antígeno de nuevo sin ningún adyuvante y por último, 2 meses más tarde, se repitió la dosis sin adyuvante, como recuerdo. Al cabo de un mes fueron sacrificados mediante sangrado total para la obtención de suero.

Para cada dosis se utilizó un volumen total de 1 ml de solución antigénica y 1 ml de adyuvante de Freund (completo e incompleto) en los casos en que se utilizó. Las 2 soluciones se mezclaron, en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar vertical, con ayuda de 2 jeringas comunicadas con una llave de tres vías, hasta formar una pasta blanca densa y homogénea. En cada dosis recibida, los conejos fueron inoculados en 6 a 8 puntos, repartidos en los dos cuartos traseros.

2.2.2. Material biológico: Recogida, procesado y conservación.

2.2.2.a. Obtención y conservación de L-3

Las larvas infestantes de las tres especies parásitas utilizadas se obtenían del material fecal recogido diariamente a los corderos donadores. Las heces quedaban retenidas bien en unas bolsas que los animales llevaban sujetas a la parte trasera mediante arneses, o bien en una rejilla que se colocaba en la parte inferior de las jaulas metabólicas donde se alojaban los animales. Con este material se realizaban coprocultivos en duquesas de plástico de 1 litro de capacidad, mezclando las heces con agua hasta alcanzar la consistencia deseada. Los cultivos se mantenían durante 8-10 días a 26 °C, asegurándonos que mantuviesen un grado suficiente de oxigenación y humedad (MAFF, 1971). Posteriormente, el material obtenido de los coprocultivos, se aplicaba a un aparato Baermann, donde las larvas quedaban separadas de la materia fecal. Por último se sometían a desecación sobre papel de filtro y se recuperaban haciéndolas pasar de nuevo por el aparato Baermann.

Si las larvas iban a ser utilizadas en nuevas infestaciones se mantenían a 4 °C en agua hasta su utilización, durante periodos que nunca superaron los 5 meses. En el caso de que su finalidad fuese la obtención de antígenos, se lavaban 3-4 veces con tampón fosfato salino 0,15 M y pH 7,4 (PBS), dejándolas sedimentar en cada ocasión. Por último se eliminaba el exceso de líquido y se rotulaban y almacenaban en criotubos a -80 °C hasta su uso.

Las muestras fecales de los animales de campo se recogieron con guantes de plástico desechables y tras realizar el análisis coprológico también se cultivaban de la misma forma, manteniendo los coprocultivos 10 días a 26 °C. Después de aislar las larvas mediante el método de Baermann, éstas se almacenaron entre 4 y 6 °C hasta su identificación.

2.2.2.b. Obtención y almacenamiento de vermes adultos

De forma general, los parásitos adultos recogidos a partir de corderos donadores infestados monoespecíficamente, eran utilizados para la extracción de material antigénico. Los adultos de **H. contortus** y de **Te. circumcincta** se recogían del abomaso, mientras que los adultos de **T. colubriformis** se localizaron mayoritariamente en el primer tercio del intestino delgado.

Tras el sacrificio de los corderos en el matadero municipal de Getafe (Madrid), se procedió a la separación del abomaso e intestino delgado del resto de contenido de la cavidad abdominal y se transportaron al laboratorio en refrigeración. Una vez allí, los abomasos fueron abiertos por la curvatura menor, y su contenido recogido en copas de sedimentación. Después, la mucosa se lavó ligeramente con el fin de recoger los vermes adultos adheridos. Los helmintos recogidos se lavaron varias veces en solución salina fisiológica (SSF) 4 °C, fueron separados de la materia grosera del contenido gástrico y recogidos con ayuda de punzones y pipetas Pasteur. En algunas ocasiones se hizo necesaria la utilización de estereomicroscopio (especialmente en la recogida de vermes adultos de **Te. circumcincta**). En el caso del intestino delgado se realizó una apertura longitudinal, y se procedió al lavado de la mucosa con SSF. Los vermes se limpiaron con ayuda de un aparato Baermann con agua templada, separándolos de esta forma del contenido intestinal. Los helmintos fueron recogidos de la misma manera. Finalmente los adultos recogidos tanto en abomaso como en intestino delgado fueron pasados a una solución de PBS que contenía inhibidores de proteasas y quelantes a las siguientes concentraciones:

Fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF).- 1mM (disuelto en propanol).

Na-p-Tosil-L-Lisina Cloro Metil Ketona (TLCK).- 50 mg/ml

N-Tosil-L-fenilalanina Cloro Metil Ketona (TPCK).- 25 mg/ml

Ac. Etilenodiaminotetraacético (EDTA).- 0,372 g/l.

Después de repetidos lavados en esta solución se eliminó el exceso de líquido, se almacenaron en criotubos, se rotularon y fueron conservados a una temperatura de -80 °C hasta su uso.

2.2.2.c. Obtención de sueros ovinos

La sangre se obtuvo mediante punción de la vena yugular y se dejó coagular a temperatura ambiente durante al menos dos horas. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos con el fin de separar el coágulo del suero, que fue recogido con una pipeta Pasteur, distribuido en alícuotas en tubos eppendorf, rotulado convenientemente y almacenado a - 20 °C hasta su utilización.

2.2.2.d. Recogida de heces y análisis coprológicos

Las heces se recogieron directamente del recto de los animales con guantes de plástico desechables. En el caso de los corderos donadores se realizaron análisis 2 veces por semana, mientras que en los animales de los grupos experimentales se realizaban 1 vez a la semana. En los animales de campo solamente se realizó un muestreo y, por tanto, un análisis coprológico.

Para la realización de los análisis coprológicos se utilizó el método de McMaster parcialmente modificado (MAFF, 1971). Se pesaron 3 gramos de heces y se disgregaron en un mortero junto con 42 ml de agua. La mezcla se homogeneizó y se filtró consecutivamente por dos mallas de 500 y 160 μ m de luz respectivamente, eliminando así las partículas groseras. Del filtrado obtenido se recogieron 10 ml en un tubo y se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se mezcló con solución salina saturada (SSS) o con sulfato de zinc al 40% ($\delta=1,3$). Finalmente se efectuó la lectura colocando 1 ml en una cámara de McMaster y observándolo al microscopio (100 x).

La existencia de L-1 de nematodos broncopulmonares se determinó mediante el método de Baermann. Se pesaron entre 10 y 30 gramos de heces y se disgregaron parcialmente. Después se empaquetaron en una gasa doble y se colocaron en el aparato Baermann, sobre agua templada con una gota de jabón. Al cabo de 8 -12 horas, se recogió el líquido almacenado al final del embudo (10 ml aproximadamente) y finalmente se observó al microscopio (100 x) para comprobar la existencia o no de larvas.

2.2.2.e. Identificación de larvas infestantes

Las L-3 obtenidas de los coprocultivos de heces de los animales muestreados en el campo, fueron identificadas siguiendo las claves del MAFF (1971) y Georgi y Georgi (1990). De cada animal se examinaba 200 L-3; en el caso de no existir un número suficiente de larvas, se examinaban todas las existentes.

2.2.2.f. Recogida de muestras en la necropsia de los animales experimentales

Al finalizar el experimento, los 55 animales de 4 razas ovinas españolas fueron sacrificados en el matadero GIRESA de Medina de Rioseco (Valladolid). Se tomaron muestras de sangre y heces de la forma ya descrita, se recogió el suero y se realizaron análisis coprológicos. Se procedió a la recogida, procesado y conservación de muestras como se describe a continuación.

a) Helmintos adultos.- Los abomasos fueron separados del aparato digestivo y sus extremos fueron ligados. Se realizó la apertura por la curvatura menor con unas tijeras y el contenido se recogió en copas de sedimentación. La mucosa del abomaso se lavó cuidadosamente con SSF, pliegue a pliegue, hasta comprobar que todos los vermes habían sido recogidos. El líquido procedente de los lavados realizados se juntó con el contenido guardado anteriormente, y se llevaron hasta un volumen final de 2 litros (con SSF). Este líquido se homogeneizó y, en agitación continua, se tomaron dos muestras de 100 ml (10% del volumen total). Las partes alícuotas se mezclaron con un volumen igual de formol 10% en PBS 2x, (resultando una concentración final de formol 5% en PBS). Las muestras se conservaron en refrigeración hasta la posterior recogida y aislamiento de los vermes adultos (MAFF, 1971).

Se realizaron, además, tomas de muestras para estudios histológicos posteriores, no incluidos en nuestro trabajo.

b) Estadios parasitarios larvarios.- La recuperación de estadios larvarios parasitarios se realizó mediante digestiones artificiales de la mucosa del abomaso, siguiendo un método ya descrito (MAFF, 1971). Después de lavar los

abomasos cuidadosamente con SSF, y tras la toma de muestras para el estudio histológico, la mucosa se raspó con un portaobjetos teniendo cuidado de no profundizar en la capa muscular. El material así recogido se depositó en recipientes de plástico, y se mezcló en una proporción de 1:4 con una solución de pepsina al 1% ajustada a pH 1 con HCl. Esta mezcla se incubó a 42 °C entre 2 y 4 horas, hasta obtener la consistencia deseada. El material recogido se conservó igual que en el caso anterior (5% formol en PBS).

2.2.2.g. Valoración de la carga parasitaria

2.2.2.g.1. Número de vermes

Se estimó el número total de parásitos teniendo en cuenta los vermes adultos, así como los estadios preadultos. Para obtener el número de parásitos adultos, se partió de las alícuotas recogidas del contenido de abomaso (10% del contenido) y conservadas en formol tamponado al 5%. Se procedió a la separación de vermes de la materia grosera y posteriormente al recuento de machos y hembras bajo estereomicroscopio (10x). La cantidad obtenida representaba, pues, el 10% del total de los vermes adultos de cada animal.

El nº de vermes inmaduros se determinó mediante observación bajo estereomicroscopio (20-30 x) de las digestiones realizadas de la mucosa gástrica. Los parásitos hallados se recuperaron mediante pipeta Pasteur para posteriores determinaciones.

2.2.2.g.2. Longitud de los vermes

Se realizaron medidas tanto de los parásitos adultos como de los estadios preadultos. Para medir los vermes adultos, éstos se dibujaron mediante cámara clara y, posteriormente fueron medidos con un curvímetro. Se midieron 40 vermes macho y 40 vermes hembra de cada animal, calculando con estos datos la media aritmética y desviación estándar. En el caso de que el nº de parásitos fuese inferior

80 (40+40), se realizaron medidas de todos los existentes (Coadwell y Ward, 1975).

Todos los vermes inmaduros se midieron en el microscopio (40-100x) con ayuda de un ocular micrométrico. Se calculó la media y desviación estándar de los datos.

2.2.2.g.3. Peso seco de los vermes

La estimación del peso seco se realizó por separado en machos y hembras, al igual que en el caso anterior, debido a la considerable diferencia de tamaño existente entre ambos sexos.

Para calcular el peso seco de los parásitos, se tomó un número de 40 vermes al azar o bien, si no existía cantidad suficiente, todos los vermes recogidos. Los parásitos se colocaban sobre un papel de filtro donde se eliminaba el exceso de humedad. Luego se pesaban en una balanza de precisión, envueltos en papel de aluminio previamente calibrado. Más tarde se les introducía en una estufa a 100 °C, donde se mantenían entre 1 a 2 horas, hasta conseguir un peso constante. Después de esta operación se pesaban de nuevo y se calculaba el peso total y el peso medio/verme.

2.2.3. Material antigénico

2.2.3.a. Obtención de antígenos parasitarios: extractos solubles

En la extracción de antígenos larvarios se emplearon las L-3 procedentes de coprocultivos de los animales donadores, mientras que los parásitos adultos provenían del abomaso e intestino delgado de dichos animales. Tanto adultos como larvas se encontraban almacenados a -80 °C, y básicamente se siguió el mismo procedimiento con ambos, aunque con ligeras diferencias. El material larvario se sometió a 3 ciclos de congelación y descongelación (-20 °C/Tª ambiente) en tanto que los parásitos adultos sufrieron 8 ciclos. Se procedió a su

triturado en un homogeneizador en vidrio en condiciones de refrigeración (4 °C), hasta comprobar la ruptura de los parásitos mediante observación al microscopio (100 x). (figura 0). Una vez alcanzada la consistencia deseada se sometió a centrifugación en tubos de polipropileno a 30000 x g (4 °C, 30 minutos) (Klesius y col., 1984). Al finalizar la centrifugación se podían observar 3 capas: el sedimento, compuesto por membranas y restos de tejidos; la fracción proteica a continuación y por último una pequeña capa lipídica en la zona superior. Todas las capas se recogieron, con cuidado de no mezclarlas, y la capa proteica se dividió en alícuotas y se almacenó en tubos eppendorf a -80 °C. Las otras 2 capas se almacenaron a la misma temperatura. La concentración proteica se determinó mediante el método de Bradford (1976).

2.2.3.b. Aislamiento y caracterización de antígenos

2.2.3.b.1. Cromatografía: Exclusión molecular, intercambio iónico y afinidad

a) Cromatografía de exclusión molecular.- La cromatografía de gel filtración se llevó a cabo en columnas de 1,5 x 85 cm (Bio-Rad), cargadas con Sephacryl S-200 (Pharmacia) disuelto en PBS a pH 7,4. El flujo de la columna se mantuvo constante (5-5,2 ml/h). El eluato se recogió en fracciones de 2 ml en todos los ensayos y en cada fracción se midió la absorbancia a 280 nm, siendo necesaria en algunos casos la determinación proteica mediante el método de Bradford. Para estimar el peso molecular de cada fracción, se comparó el volumen de elución de cada una de ellas con una recta patrón realizada a partir de los volúmenes de elución de proteínas cuyo peso molecular era conocido. Estas proteínas fueron: β -amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y Citocromo C (12,4 kDa). Se utilizó también azul dextrano (2000 kDa) para conocer el volumen de exclusión de la columna.

Se emplearon tanto extractos solubles de adultos (ESA) como de L-3 (ESL) de **H. contortus**. Las concentraciones proteicas de las muestras oscilaron entre 5,8 y 10,8 mg/ml en el caso del ESA, y alrededor de 5 mg/ml en el caso del ESL. En cada ensayo se introdujo en la columna un volumen de 2 ml junto con una pequeña cantidad de sacarosa para incrementar la densidad de la muestra, favoreciendo así una entrada homogénea en el gel.

b) Cromatografía de intercambio iónico.- En este caso, se utilizaron columnas de 1 x 30 cm, cargadas con un intercambiador aniónico (DEAE-Sephacel, Sigma). Tanto la disolución del gel como la elución de las proteínas unidas, se realizaron en tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7,4. Además, antes de introducirse en la columna, las muestras se dializaron frente al mencionado tampón. La elución se llevó a cabo aplicando un gradiente continuo salino (NaCl 0-0,4 M). Se recogieron fracciones de 2 ml que fueron valoradas mediante absorbancia a 280 nm. Posteriormente se dializaron frente a PBS para evitar el exceso salino del gradiente.

Al igual que en el caso anterior se utilizaron los extractos solubles de **H. contortus** de que disponíamos (ESA y ESL), así como mezclas de las fracciones procedentes de gel filtración que fueron seleccionadas por nosotros. El volumen introducido en cada caso varió en función de las concentraciones proteicas de las muestras. La cantidad de proteína que se introdujo en la columna osciló entre 2 y 8 mg en los ensayos realizados.

c) Cromatografía de afinidad.- Se empleó una columna de 5 ml, con un filtro en la parte inferior para evitar la salida del gel. Se utilizaron 2 geles: S-hexilglutation unido mediante epoxi activación a un gel de agarosa y bromosulfoftaleína unido mediante activación con bromuro de cianógeno a agarosa (BSP-GSH-agarosa) (Sigma). Para introducir la muestra se utilizó tampón fosfato 22 mM, pH 7. Se realizó una elución inespecífica con el fin de eliminar impurezas con 0,5 M de NaCl en el mismo tampón, o bien 2M de NaCl, y posteriormente se eluyó de forma específica con tampón 50 mM Tris pH 9,6 que contenía 5 mM de glutation reducida o bien 5 mM de β -mercaptoetanol. La elución se realizó con tampón 50 mM Tris pH 10,5 cuando se utilizó el gel BSP-GSH-agarosa. La actividad de la enzima fue determinada mediante el método de Habig y col. (1974), con ligeras modificaciones (Simons y Vader Jagt, 1977). Este método está basado en la capacidad de conjugación de la enzima con el sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (1 mM, disuelto a un 4% en etanol), en presencia de 1 mM de glutation reducida. Se determinó el cambio de absorbancia a 25 °C y 340 nm durante 3 minutos. Una unidad de actividad correspondió en nuestras condiciones a un cambio de 3,2 unidades de densidad óptica por minuto.

Las fracciones procedentes de gel filtración, intercambio iónico y afinidad fueron sometidas, en algunos casos, a concentración con acetona a -20 °C, para así poder ser empleadas en posteriores análisis.

2.2.3.b.2. Electroforesis de proteínas

La separación de las proteínas se realizó en gel de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE). Se utilizaron las mismas condiciones de Cuquerella y col. (1991). Las concentraciones finales de acrilamida escogidas fueron de 10,5 ó 12,5% en los geles de separación, y 3 % en los geles de empaquetamiento. Además contenían un 0,05% de dodecil sulfato sódico (SDS). Los geles se elaboraron en tampón Tris-HCl 1 M, pH 8,8 en los geles de separación y 6,8 en los geles de empaquetamiento. Una vez mezclados los componentes, el líquido se vertió entre dos cristales de vidrio de 10 x 10 cm, sellados y separados entre sí 0,5 mm, donde se dejó polimerizar a temperatura ambiente con ayuda de persulfato amónico y Tetrametiletilendiamina (Temed). Dichos geles se emplearon en un plazo de 24 horas.

Las muestras fueron desnaturalizadas y reducidas mediante 1% SDS y 5% de β -mercaptoetanol respectivamente, y llevadas a ebullición (100 °C 10 min) y se introdujeron en los pocillos realizados en el gel de empaquetamiento, incluídas en un tampón que contenía glicerina y azul de bromofenol. Una vez aplicadas las muestras a los pocillos, la electroforesis se realizó en 0,025 M Tris, 0,192 M glicina y 0,1 % de SDS. Se sometió el gel a una diferencia de potencial de 60 V hasta que se observó que el frente señalado con azul de bromofenol entraba en el gel de separación. A partir de este momento, la diferencia de potencial se elevó a 150 V y se mantuvo así hasta la finalización de la electroforesis.

Una vez acabado este proceso, los geles fueron teñidos generalmente con azul de Coomassie. En otras ocasiones se utilizó la tinción de nitrato de plata (Bio-Rad silver stain kit), bien cuando las bandas no eran visibles o bien cuando se quería comprobar la pureza electroforética de las muestras. Para la visualización de las bandas mediante azul de Coomassie se utilizaron las siguientes soluciones y tiempos de tinción y desteñido.

Solución de tinción	0,1 % p/v azul de Coomassie R 250 41,7% v/v metanol 16,7% v/v ac. acético 1% p/v Sulfato amónico agua destilada c.s.
---------------------	--

Los geles permanecieron en agitación en esta solución entre 2 y 4 horas. Después se eliminó esta solución y se aplicó la siguiente.

Solución de desteñido	30% v/v metanol 10% v/v ac. acético agua destilada c. s.
-----------------------	--

Los geles se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente en esta solución hasta comprobar que el fondo del gel estaba completamente desteñado y que las bandas de proteínas eran claramente visibles. Posteriormente se conservaron en metanol al 50% en refrigeración, o bien se procedió a su secado entre 2 pliegos de papel celofán.

En todos los geles se utilizó un pocillo con marcadores de bajo peso molecular (Pharmacia), los cuales fueron tratados de la misma forma que el resto de las muestras. Posteriormente se realizaron curvas patrón y se calculó el peso molecular de las proteínas de interés.

2.2.3.b.3. Detección de glicoproteínas

La detección de glicoproteínas se realizó mediante tinción con digoxigenina (DIG glycan detection kit, Boehringer Mannheim). Las proteínas a analizar fueron separadas electroforéticamente y posteriormente transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0,4 μ m (Millipore). Las transferencias se realizaron siguiendo el método que se describirá, más adelante, en las inmunodetecciones (apartado 2.2.4.c.). La detección de los glicoconjugados se basa en la oxidación de los grupos hidroxilos de los azúcares mediante metaperiodato sódico, transformándose así en grupos aldehído. Estos grupos se unen covalentemente a la digoxigenina, que es detectada mediante un enzimoimmunoensayo,

visualizándose las bandas proteicas que contienen azúcares de un color marrón grisáceo sobre fondo blanco.

2.2.3.c. Secuenciación N-terminal de proteínas

La determinación de los últimos restos aminoácidos del extremo N-terminal se realizó en el Laboratorio de Proteínas del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (Universidad Autónoma de Madrid). Para ello se utilizó un secuenciador automático (ABI 473 A pulsed-liquid phase protein sequencer, Applied Biosystems, USA) empleando los ciclos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para llevar a cabo la secuenciación se realizó una electroforesis en idénticas condiciones que las descritas anteriormente, excepto que en la cubeta superior de la electroforesis se adicionaron 350 µl de glutation reducida 10 mM en 70 ml de tampón de electroforesis y se precorrieron los geles a 150 V durante 90 minutos para eliminar los productos derivados de la polimerización de la acrilamida. La electroforesis se desarrolló con la solución habitual que contenía 70 µl de tioglicolato sódico 100 mM en 70 ml de solución de electroforesis, colocados en la parte superior de la cubeta, con el fin de evitar interferencias con el análisis secuencial. Posteriormente las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Millipore), y al día siguiente se comprobó que la transferencia había sido correcta mediante tinción con 0,2% de Ponceau S (sal sódica) en 3% de ácido tricloroacético. Se escindió de la membrana la banda teñida correspondiente al péptido escogido y se procedió a su secuenciación.

2.2.4. Ensayos inmunológicos

2.2.4.a. Enzimoimmunoensayos

2.2.4.a.1. Detección de anticuerpos ovinos

Los ELISA se realizaron en las condiciones descritas por Cuquerella y col. (1991) con algunas modificaciones. Los antígenos se permitieron fijar durante 16 h

a 4 °C a las placas de poliestireno (Nunc). Para ello se diluyeron en tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9,6 hasta las concentraciones deseadas en cada caso (desde 1,75 hasta 10 µg/ml). A continuación, y después de 3 lavados de 5 minutos cada uno con 0,05% Tween-20 en PBS (PBST), se procedió a bloquear los lugares libres de las placas con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% en PBS, incubándolas a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron de la misma forma y posteriormente se aplicó el suero a los pocillos, empleándolo a distintas diluciones en PBST con BSA al 1 %. De nuevo se incubaron las placas 60 minutos a 37 °C y se lavaron de la misma manera. El conjugado (anti IgG de oveja marcada con fosfatasa alcalina, Bio-Rad) se empleó a dilución 1/1000 en PBST con BSA al 1%, y se incubó de la misma forma. Después de nuevos lavados se aplicó el sustrato (1 mg/ml paranitrofenil fosfato, Boehringer Mannheim) disuelto en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 y se dejó reaccionar durante 1 hora a 37 °C. El color desarrollado se midió en un lector de ELISA mediante absorbancia a 405 nm. El valor final se obtuvo restando a cada pocillo el fondo resultante en cada placa, derivado de la unión inespecífica del conjugado a la BSA.

Para la determinación de IgG₁ se empleó una dilución de suero de 1/3200 . El anticuerpo anti-IgG₁ (Universidad de Utrecht, Holanda) se utilizó a una dilución 1/4000, mientras que el conjugado, anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa, fue diluido 1/3000. La reacción se desarrolló con el sustrato ABTS (0,011%) en tampón cítrico fosfato 0,1 M pH 4, y en presencia de peróxido de hidrógeno (0,008%) durante 30 minutos a 37 °C. La lectura de la reacción se llevó a cabo a 405 nm de absorbancia. Esta reacción con el sustrato se empleó, además, en las determinaciones de IgG₂, IgA e IgM.

En el ensayo realizado para determinar IgG₂ se empleó el suero a 1/200 de dilución. El anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón con afinidad para la IgG₂ ovina y bovina (Serotec) se empleó a dilución 1/200, mientras que el conjugado, anti-IgG₁ de ratón marcado con peroxidasa (Serotec), se utilizó a una dilución 1/100.

La determinación de IgA sérica mediante ELISA fue realizada con una dilución de suero 1/50. El anticuerpo anti-IgA bovina (Nordic) se añadió a dilución 1/1000 y el conjugado anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa se utilizó en dilución 1/3000.

Para el ensayo realizado en la determinación de IgM sérica ovina se diluyó el suero 1/100, mientras que el conjugado, anti-IgM bovina/ovina marcada con peroxidasa (Nordic) se empleó a una dilución 1/4000. Los tiempos y tampones utilizados en las incubaciones de suero, anticuerpos y conjugados de las determinaciones de IgG₁, IgG₂, IgA e IgM fueron los mismos que en los ensayos realizados para la determinación de IgG.

2.2.4.a.2. Detección de anticuerpos en los sueros hiperinmunes

En los ensayos realizados para la determinación de IgG en los sueros de los conejos inmunizados se empleó el antígeno a la concentración de 1 mg/ml en Tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6, y el suero a dilución 1/2000 en tampón 1% BSA PBST. Los procedimientos empleados en el bloqueo de las placas con BSA, así como el empleo de conjugado (anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa) y desarrollo del color fueron los mismos que en los ensayos realizados para la detección de IgG₁ e IgA.

2.2.4.b. Inmunodetecciones

Se empleó el método descrito por Cuquerella y col. (1991). Para llevar a cabo las inmunodetecciones se emplearon membranas de Nylon (Immobilon P, Millipore). Sobre estas membranas se fijaron las proteínas que previamente habían sido separadas mediante electroforesis desnaturalizante y reductora. Después del tratamiento de la membrana, ésta se colocó directamente sobre el gel, y colocando a ambos lados esponjas y papel de filtro, encerrando todo esto en un cartucho de transferencia. Las burbujas existentes fueron cuidadosamente eliminadas. El cartucho se introdujo en la cubeta de manera que el gel quedase en el lado correspondiente al cátodo y la membrana en el lado correspondiente al ánodo. La cubeta se rellenó con una solución 25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% v/v metanol. La transferencia se efectuó aplicando una corriente de 12 mA durante toda la noche. Al día siguiente la corriente se elevó hasta 56 mA y se mantuvo en refrigeración con agua durante 90 minutos.

Una vez terminada la transferencia, se comprobó si había sido efectiva mediante tinción con negro amido. Después la membrana se lavó 3 veces (10, 5 y 5 minutos) con tampón Tris salino (10 mM Tris-HCl y 0,15 M NaCl, pH=7,3) (TBS) que contenía 0,05% de Tween-20 (TBST) y posteriormente fue bloqueada durante 1 hora a temperatura ambiente con leche desnatada en polvo (Molico Sveltesse, Nestlé) al 5% en TBST. A continuación se lavó de nuevo y se cortó en tiras de unos 0,4 cm de anchura, las cuales se incubaron con 2 ml de suero a dilución 1/100 en la solución bloqueadora anterior, en tubos de vidrio de 5 ml, durante 3 horas a 37 °C. Previo lavado en PBST se les incubó durante 60 minutos a 37 °C con 2 ml de conjugado (anti-IgG de oveja marcada con peroxidasa, Sigma) a dilución 1 / 1000 en TBST. Después de 2 lavados de 5 minutos en TBST y otros 2 en TBS, se desarrolló la reacción colorimétrica con el sustrato. Para ello se utilizó 4-Cl-Naftol (5 µg/ml) y peróxido de hidrógeno al 0,0015%, manteniéndose las membranas en la solución durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo sumergiendo las tiras en agua destilada.

2.2.5. Tratamiento estadístico

Los datos obtenidos fueron transformados en logaritmos (x+1) (número de vermes) o bien en raíz cuadrada (recuentos de huevos) para su normalización. A continuación se utilizó un análisis de la varianza para comprobar la existencia o no de diferencias significativas entre los grupos, comparándolas mediante t de Student, F de Snedecor o bien pruebas de homogeneidad (X²) (Sokal y Rohlf, 1986).

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Respuesta de razas ovinas autóctonas a las infestaciones por **H.contortus**

3.1.1. Eliminación fecal de huevos de **H.contortus**

Las determinaciones semanales de la eliminación fecal de huevos de *H. contortus* correspondientes a los corderos empleados en las infestaciones experimentales de cuatro razas ovinas autóctonas españolas se muestran en las figuras 1-4, donde aparecen los datos correspondientes transformados (raíz de hpg). El periodo de prepatencia de las infestaciones con la dosis inicial de 200 L3/Kg fue de 16 a 19 días, aunque en todos los grupos aparecieron animales que eliminaron huevos en heces el día 16 postinfestación (p.i.). Los patrones de eliminaciones de huevos que aparecen en las gráficas fueron comparables entre las razas, mostrando como valores medios picos de entre 3717 hpg detectados en el grupo Ch2 el día 35 p.i. y 4693 hpg detectados el día 28 p.i. en el grupo Me2, similares a los obtenidos en los grupos C2 (4100 hpg el día 42 p.i.) y Ma2 (3850 hpg el día 28 p.i.). A partir de los días de máxima eliminación se evidenció una tendencia descendente, menos notable en los valores medios transformados. El sumatorio de los valores medios correspondientes a las determinaciones semanales de las eliminaciones fecales durante la patencia (día 21-77 p.i.) resultó, asimismo, similar en todas las razas: 21339 hpg en el grupo C2, 22430 hpg en el grupo Ch2, 24477 hpg en el grupo Me2 y 25713 hpg en Ma2.

Durante el reto con una dosis de 400 L3/Kg, los animales que fueron infestados por vez primera (Grupo 1) comenzaron a eliminar huevos en las heces entre los días 16 a 21 p.i.; mientras en los grupos C1 y Ch1 existieron animales con periodos prepatentes de 16 días, en el grupo Ma1 el menor periodo prepatente detectado fue de 17 días y el grupo Me1 no comenzó a eliminar huevos hasta el día 18 p.i.. Asimismo, los sumatorios de los valores medios de cada grupo (21-42 días p.i.) sí resultaron ligeramente diferentes en los animales primoinfestados pertenecientes a las diferentes razas ovinas estudiadas: el valor más alto lo presentó el grupo C1 (32038 hpg), mientras que los grupos Ch1 y Ma1 mostraron valores similares entre sí (22737 y 20463 hpg respectivamente) y los animales merinos primoinfestados se mostraron menos receptivos (12563 hpg).

Cuando se empleó la misma dosis de L3 en aquellos animales que habían sido previamente infestados (grupo 2) se comprobaron alargamientos en los periodos prepatentes de estos animales respecto a los animales de su misma raza que habían sido infestados por primera vez. En el grupo C2 los animales comenzaron la patencia entre los días 20 y 24 p.i., mientras que en los grupos Ch2 y Ma2 este periodo se amplió entre los días 19 a 25 p.i., al igual que sucedió en los machos del grupo Me2; sin embargo, en las hembras de este último grupo únicamente se eliminaron huevos ocasionalmente en cantidades muy pequeñas. Además, al comparar los sumatorios de las eliminaciones fecales medias estimadas en el periodo comprendido entre los días 21-49 p.i. tras la dosis de prueba correspondientes a los grupos primo- y reinfestados observamos importantes reducciones, siendo la más importante la del grupo Ma2 (85%), y la menor hallada en el grupo Me2 (60,1%), a la vez que los grupos C2 y Ch2 mostraron reducciones notables (79,2% y 70,5% respectivamente). En las figuras 1-4 aparecen mostrados los días en los que las diferencias encontradas entre los valores medios de eliminación fecal de huevos de ambos grupos experimentales (primo- y reinfestados) resultaron estadísticamente significativas cuando se utilizaron los valores sin transformar. Observamos que las diferencias encontradas fueron más numerosas en las razas Castellana y Churra y en menor medida en la raza Merina, y en la raza Manchega no existieron.

Analizando los datos en conjunto observamos que no existieron diferencias de comportamiento frente a infestaciones con dosis larvarias moderadas (200 L3/Kg) entre las razas estudiadas. Sin embargo, cuando se emplearon dosis infestantes superiores, comprobamos diferentes grados de receptividad de los animales empleados resultando, de este modo, la raza Castellana la más receptiva al establecimiento parasitario, o bien la que más favoreció la fertilidad de las hembras de **H. contortus**. Las razas Churra y Manchega fueron similares en sus eliminaciones medias de huevos en las heces, a pesar de la cantidad superior de larvas recibida por la raza Manchega debido a su mayor peso. En la raza Merina se hallaron las menores eliminaciones fecales de huevos y quizás por esta razón resultó, también, la que menos protección pareció mostrar en los animales que fueron reinfestados. En general, todos los grupos de animales reinfestados parecieron responder de forma adecuada a la segunda infestación cuando se les comparó con los animales primoinfestados.

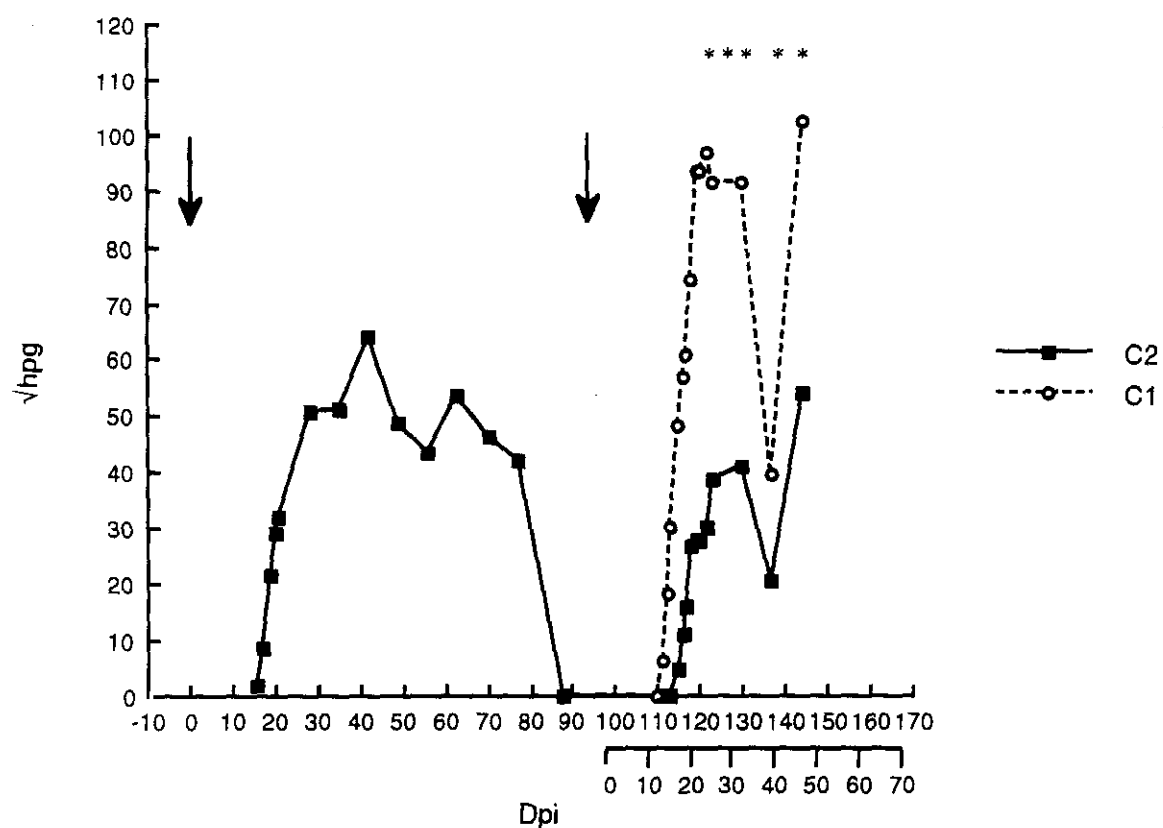


Figura 1. Eliminación fecal de huevos de *H. contortus* en las infestaciones experimentales realizadas en la raza Castellana. (*) Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 1 y 2.

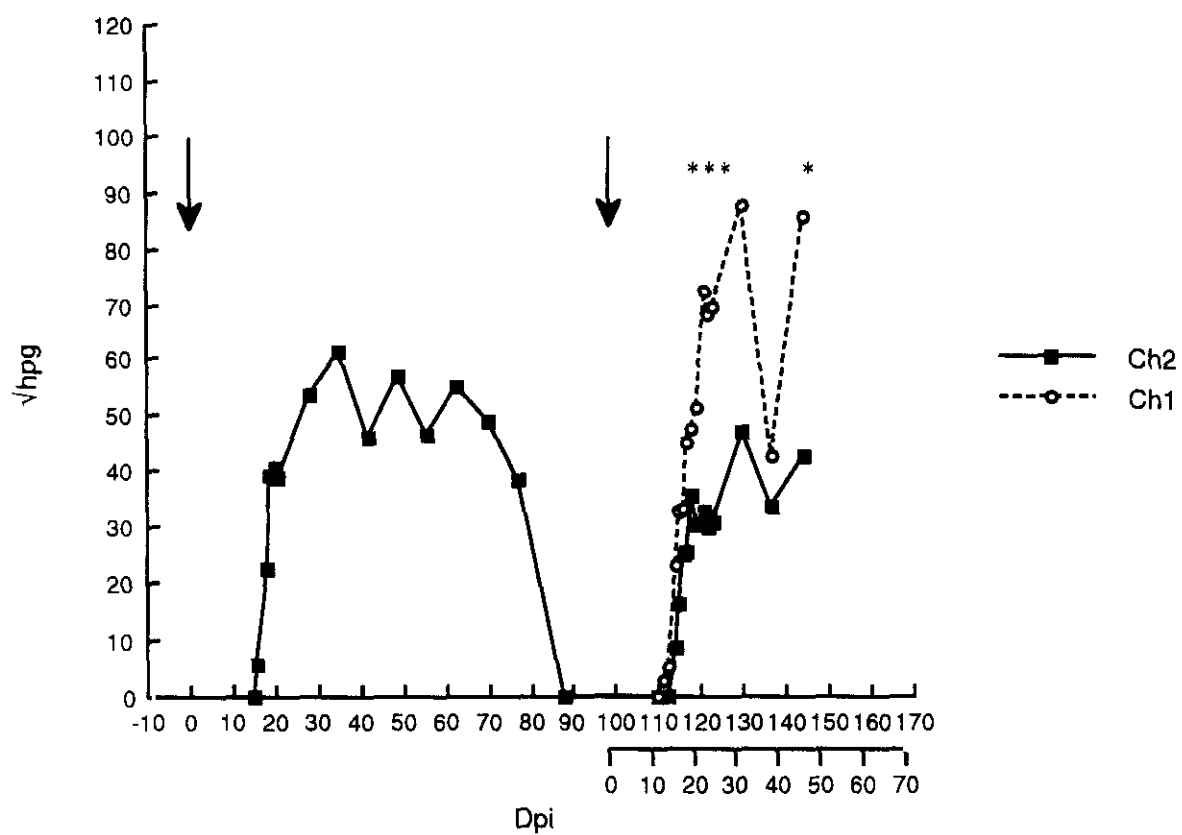


Figura 2. Eliminación fecal de huevos de **H. contortus** en las infestaciones experimentales realizadas en la raza Churra. (*) Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 1 y 2.

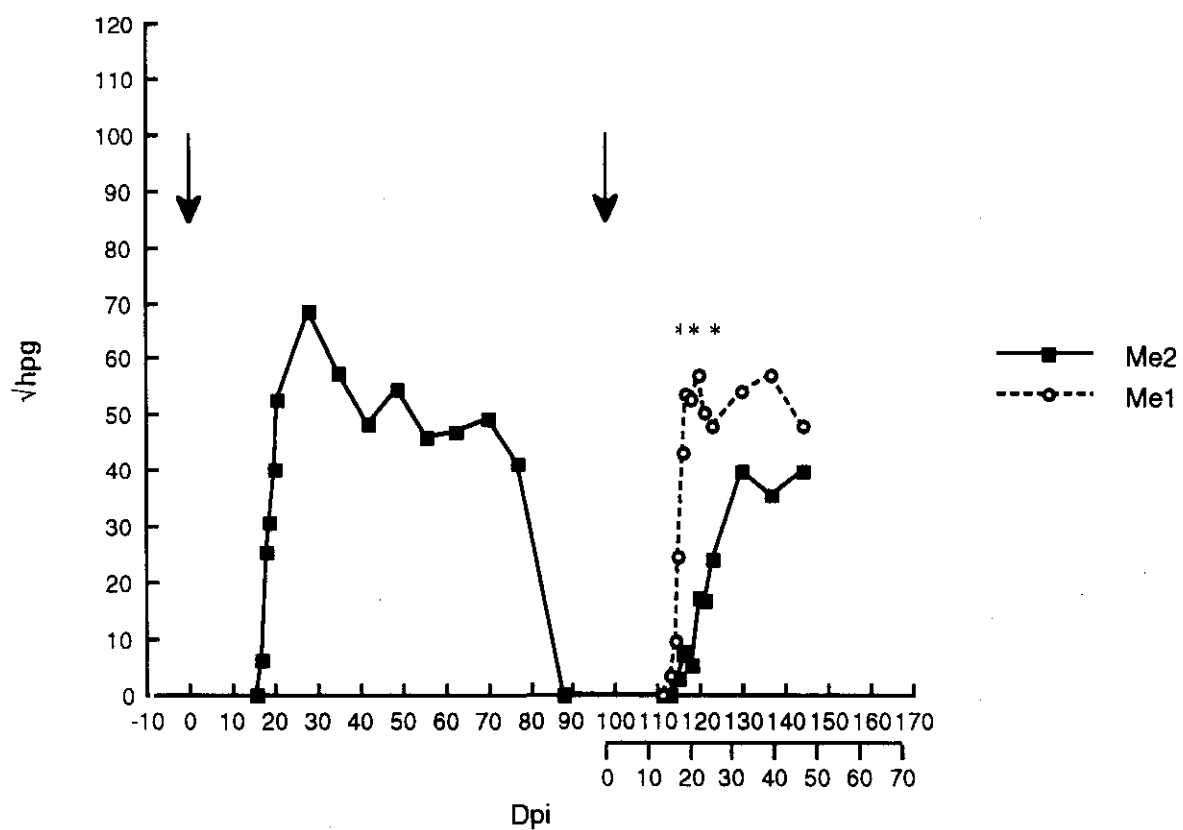


Figura 3. Eliminación fecal de huevos de *H. contortus* en las infestaciones experimentales realizadas en la raza Merina. (*) Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 1 y 2.

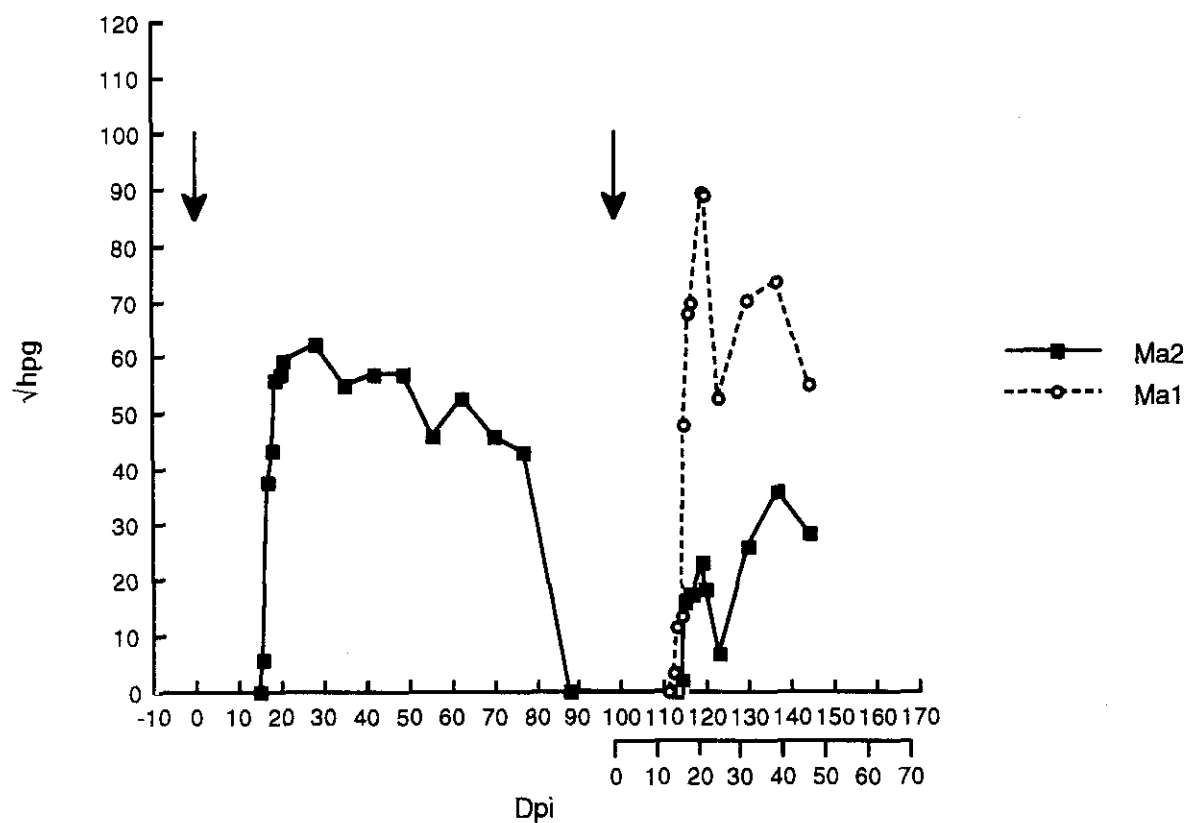


Figura 4. Eliminación fecal de huevos de **H. contortus** en las infestaciones experimentales realizadas en la raza Manchega. (*) Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 1 y 2.

3.1.2. Respuesta inmunitaria. Niveles de anticuerpos séricos anti-**Haemonchus** en las razas ovinas autóctonas estudiadas

3.1.2.a. Respuesta IgG

Se estudió la respuesta sérica en los animales a lo largo de todo el periodo experimental. Se utilizaron sueros individuales de los animales de las cuatro razas estudiadas, correspondientes a 8 momentos del experimento, empleando en el ELISA dos extractos antigénicos: extracto soluble de adultos (ESA) y extracto soluble de Larvas 3 (ESL) y expresando los resultados como incrementos en los niveles de absorbancia a 405 nm (A405).

En las Figuras 5a y b aparecen representados los niveles de anticuerpos de tipo IgG frente a extracto soluble de adultos (a) y L3 (b) correspondientes a la raza Castellana. Los animales de raza castellana mostraron, como norma, una mayor respuesta de IgG sérica anti-**Haemonchus** que el resto de las razas, tanto con ESL como con ESA. Los niveles máximos alcanzados fueron $A > 0.450$ con ESA y $A > 0.500$ con ESL. Aunque las figuras obtenidas con ambos extractos antigénicos fueron similares, se observaron algunas características particulares.

Tras la primoinfestación del Grupo 2 (C2), existió una elevación de los niveles de IgG anti-ESL, ya visible en la prepatencia (día 7 p.i.) y que alcanzó valores de 0.2 A405 durante la patencia de esta infestación, disminuyendo tras el tratamiento. Esta elevación transitoria no se observó tan claramente empleando antígeno de adultos de **H. contortus** (ESA). Tras recibir la dosis de prueba existió una elevación, con ambas fuentes antigénicas, siendo el incremento observado en los Grupos C1 y C2, similar respecto a los valores de A405 obtenidos previamente a esta dosificación, y por ello, mayor en valores absolutos en el Grupo C2 tanto empleando ESL como ESA en el ELISA desarrollado, existiendo evidencias de una ligera respuesta secundaria en esta raza ovina y en nuestras condiciones experimentales.

Las Figuras 6a y b muestran los niveles de anticuerpos IgG específicos detectados en los animales de raza Churra en 8 estimaciones individuales a lo largo de la experimentación, en los dos grupos (Ch1 y Ch2), con ambos extractos antigénicos (ESL y ESA), y representados como incrementos de A405. Los perfiles obtenidos fueron muy similares con ambos extractos antigénicos. La

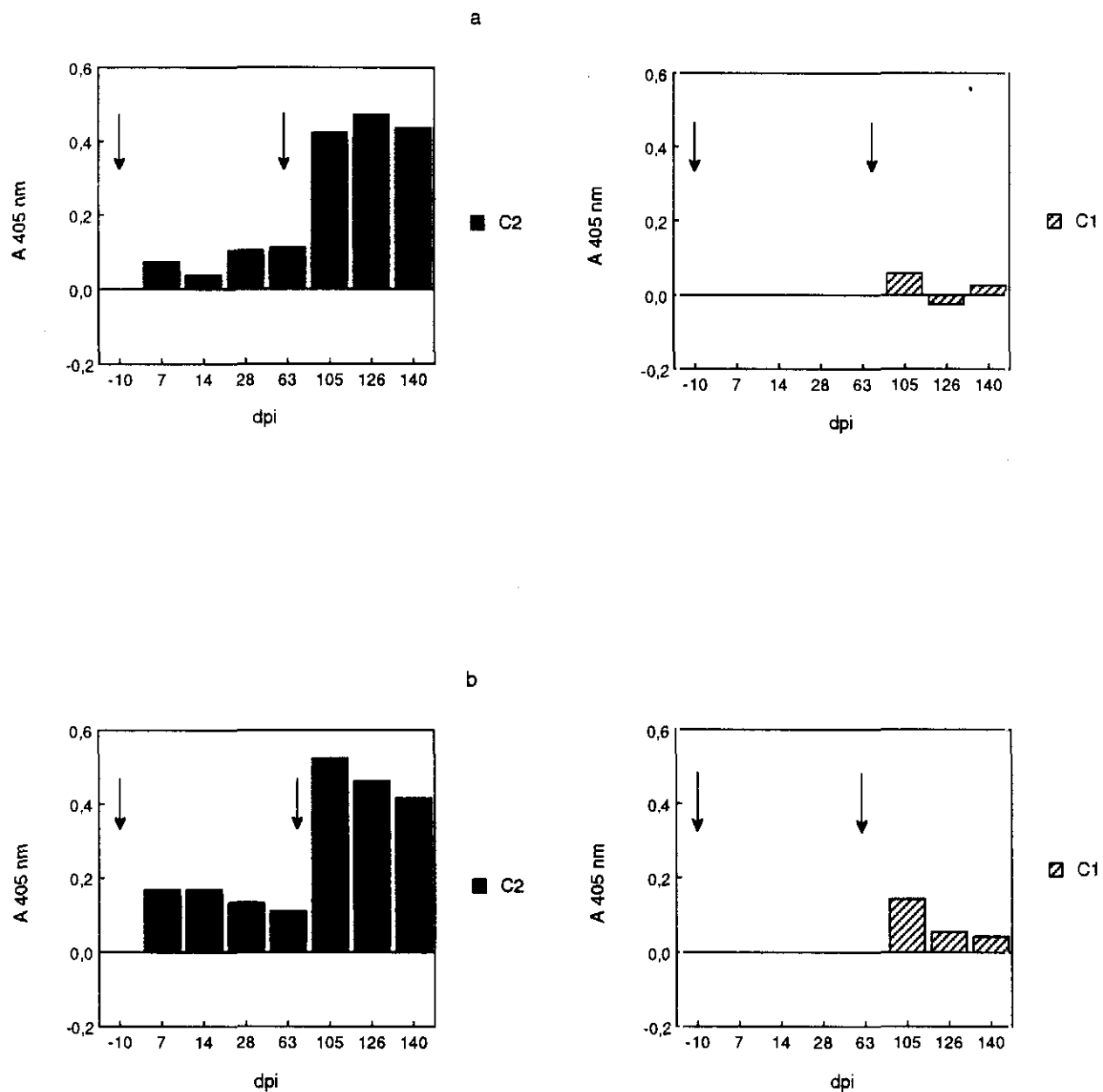


Figura 5. Valor de los anticuerpos de tipo G frente a extracto soluble de adultos (a) y L3 (b) a lo largo de la experimentación correspondientes a los animales de raza Castellana.

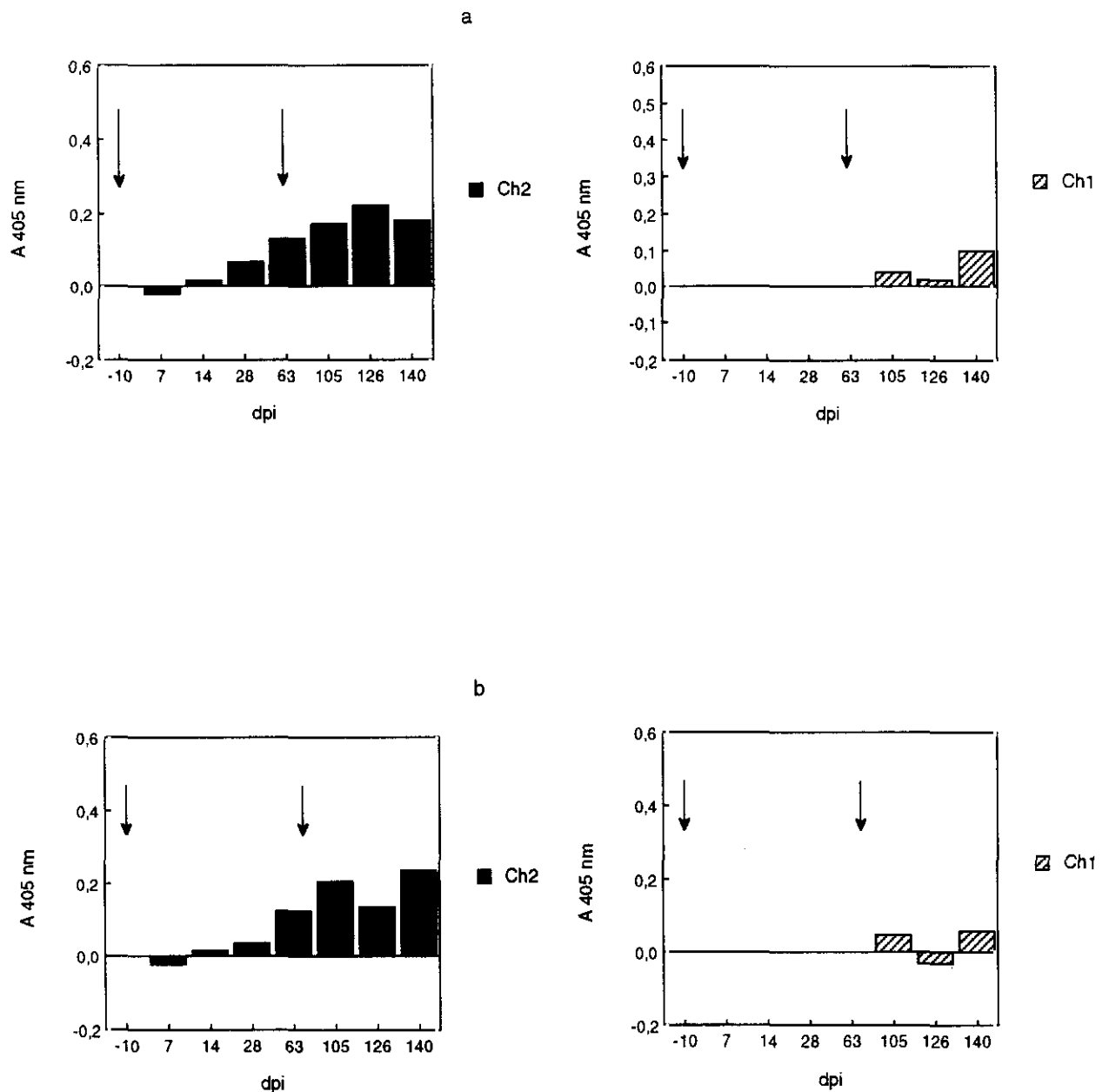


Figura 6. Valor de los anticuerpos de tipo G frente a extracto soluble de adultos (a) y L3 (b) a lo largo de la experimentación correspondientes a los animales de raza Churra.

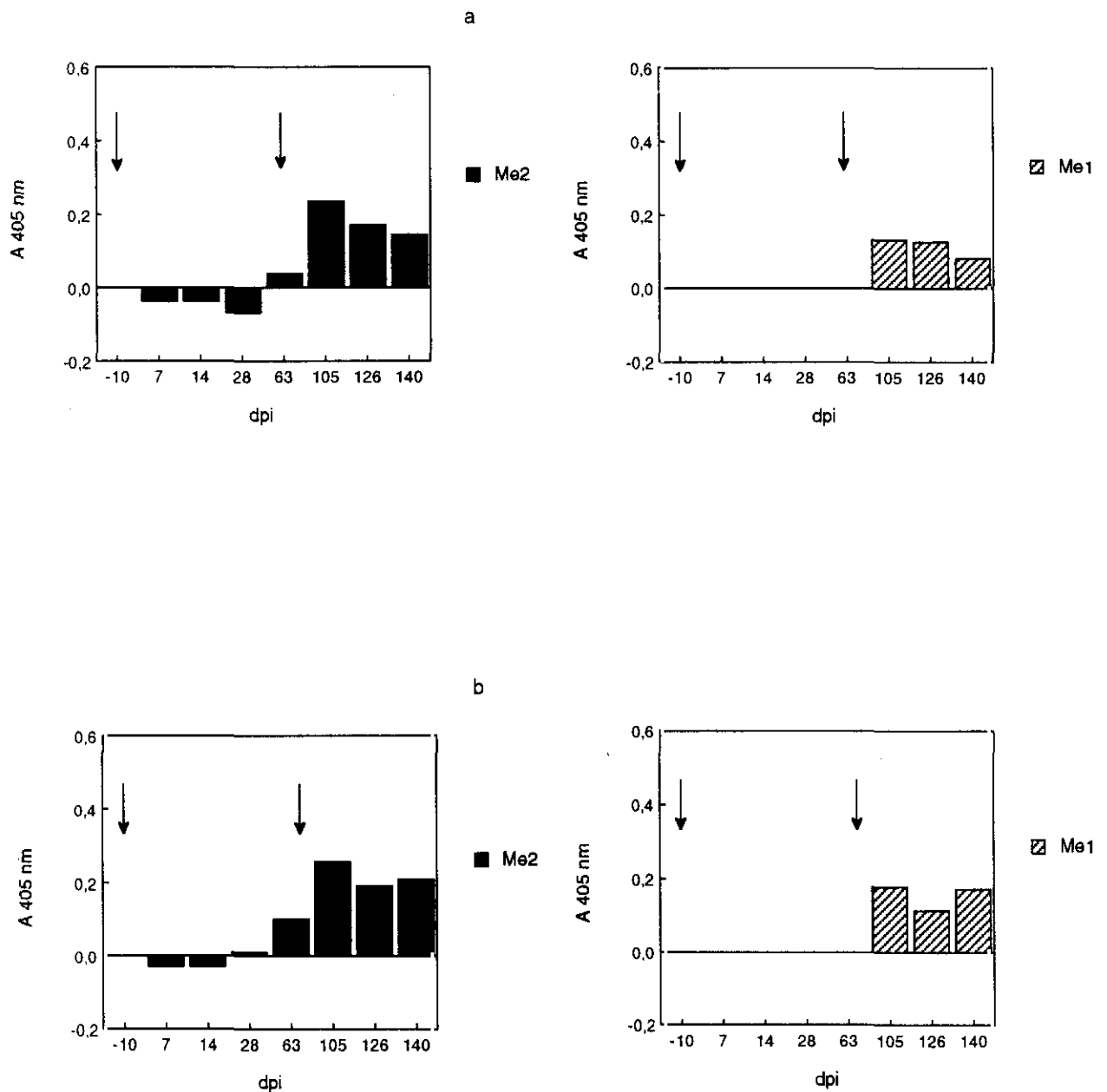


Figura 7. Valor de los anticuerpos de tipo G frente a extracto soluble de adultos (a) y L3 (b) a lo largo de la experimentación correspondientes a los animales de raza Merina.

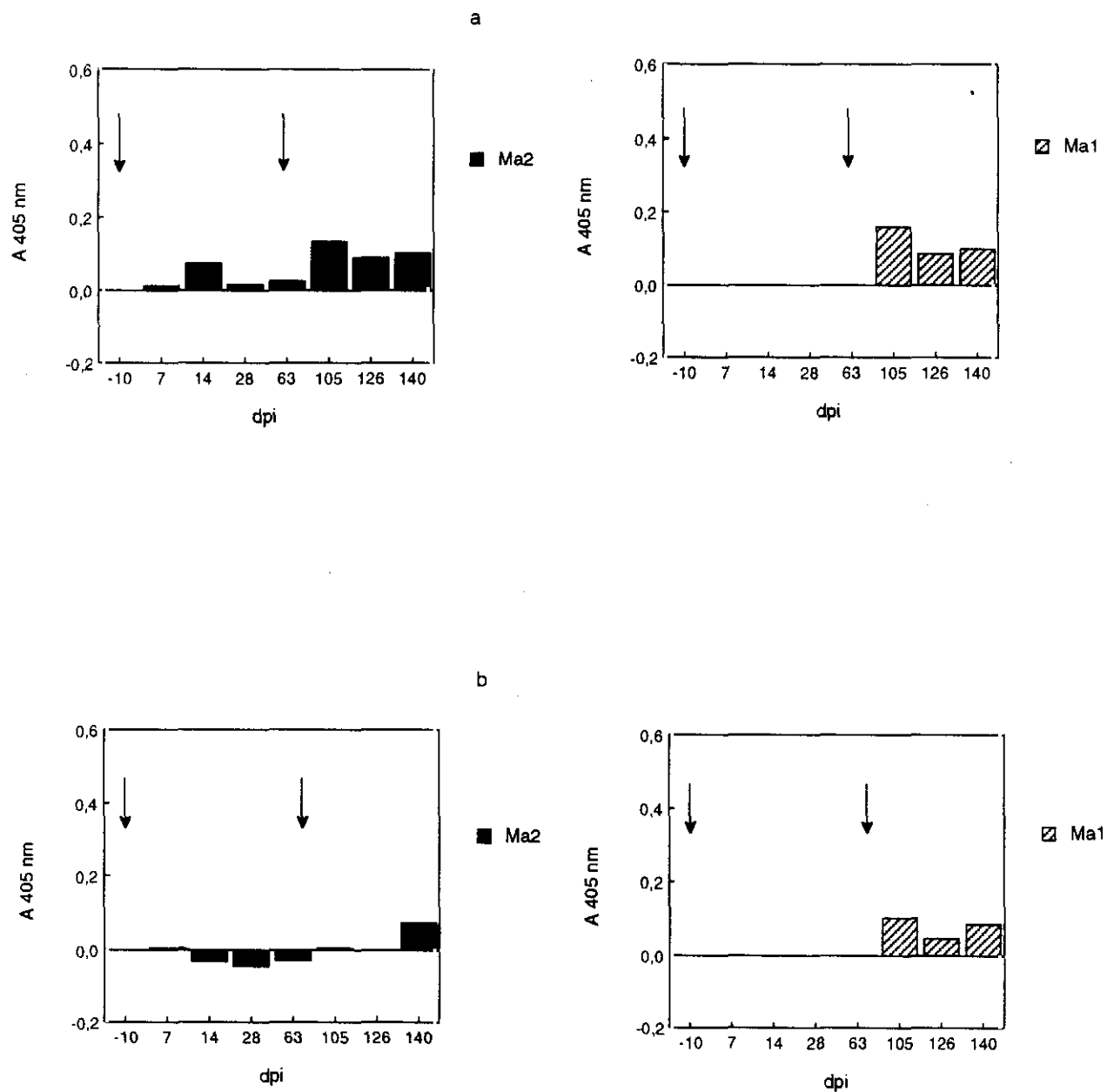


Figura 8. Valor de los anticuerpos de tipo G frente a extracto soluble de adultos (a) y L3 (b) a lo largo de la experimentación correspondientes a los animales de raza Manchega.

primoinfestación con 200 L3/Kg (Ch2) sólo provocó una ligera elevación en los valores de Absorbancia, mientras que la dosis de prueba, con una dosis infestante doble, determinó superiores valores de A405. En ambos casos la respuesta aparentemente fue dependiente de la dosis infestante empleada siendo la primoinfestación incapaz de provocar una respuesta sensible.

El estudio de la respuesta IgG sérica realizado en la raza Merina con ESL y ESA se muestra en las Figuras 7a y 7b. También en esta raza las figuras obtenidas fueron semejantes. No obstante conviene señalar que sólo se observaron elevaciones netas en los valores de A405 tras la dosis de prueba. De hecho, se observó una depresión en los niveles de IgG tanto con ESL como, especialmente, con ESA tras la primoexposición del Grupo 2, coincidente con la prepatencia e inicio de la patencia de la infestación, para recuperarse posteriormente y finalmente mostrar una elevación >0.2 , tras recibir la dosis de prueba. Resultados similares fueron obtenidos en el Grupo de Merina 1 (Me1) tras recibir la dosis de prueba. Esta depresión, visible también, aunque en mucha menor medida en la raza Churra (ver arriba) y en la raza Manchega, probablemente no fue real sino relacionada con la hipoproteinemia observada en esta raza tras recibir las infestaciones con 200 L3/Kg (Me2) y 400 L3/Kg (Me1). A pesar del número no muy elevado de animales se apreció que la respuesta IgG anti-**Haemonchus** más notable se presentó en esta raza en las hembras.

Los animales de raza Manchega mostraron una capacidad de respuesta de anticuerpos muy débil (< 0.2), como muestran las Figuras 8a y 8b. El patrón obtenido empleando en el ELISA el antígeno larvario (ESL) fue menos definido mientras que la respuesta frente a ESA fue más consistente, hallándose ligeros incrementos en los niveles de A405, en dependencia del estímulo antigénico suministrado por las dosis infestantes recibidas. Esta circunstancia fue particularmente clara en el grupo Ma2. Al igual que en los casos anteriores los títulos séricos estuvieron relacionados con los niveles de proteínas hallados en los mismos animales y días de análisis.

3.1.2.a.1. Respuesta IgG₁ anti-**Haemonchus**

Dentro de la repuesta sérica de tipo IgG, se diferenciaron, además, los principales isotipos, IgG₁ e IgG₂. La mayor contribución a la cantidad de

anticuerpos séricos la realizan las inmunoglobulinas de tipo IgG₁. Por ello, en la valoración de los niveles de IgG₁ específicos de **H.contortus**, empleando ambos extractos antigénicos (ESL,ESA) (Tabla I), fueron similares a los obtenidos al determinar la respuesta específica IgG, en las razas ovinas estudiadas en el presente trabajo. De forma general, los valores de A405 fueron superiores al emplear ESL como antígeno y ligeramente adelantada respecto a los valores de IgG₁ anti-ESA obtenidos.

En los animales de raza castellana, la primoinfestación del Grupo 2 (C2) provocó una elevación significativa en los valores de A405, ya visible en la prepatencia de la infestación que alcanzó valores superiores a 0.2 en la patencia (25 días p.i.) al emplear ESL. Los valores obtenidos con ESA fueron inferiores. La administración de la dosis de prueba (400 L3/Kg p.v.) provocó una elevación en ambos grupos de corderos, C1 y C2, más notable en los animales que habían sido sometidos previamente a una parasitación con **H.contortus**. La raza Castellana, mostró, en su conjunto la mayor reactividad frente al parásito, empleando ESL y ESA en los ensayos realizados por nosotros.

En la Tabla I se muestran los niveles de IgG₁ sérica anti-**Haemonchus** detectada en los animales de raza Churra durante el periodo experimental. El incremento observado en el grupo Ch2 durante la patencia de la infestación con 400 L3/Kg p.v. fue superior al hallado en el Grupo Ch1 pero sin evidencia de respuesta secundaria, ya que los niveles de IgG₁ antes de la dosis de prueba eran superiores a los de Ch1 y, por ello, una comparación directa no fue posible. De una forma similar a lo hallado en la raza Castellana la respuesta anti-ESL estuvo ligeramente adelantada respecto a la anti-ESA. Sin embargo, al contrario de lo observado en la raza anterior, la respuesta (A405nm) fue mayor frente a ESA.

En la raza Merina se observaron, asimismo, claras diferencias entre el grupo Me2 y el resto de los animales (ver Tabla I), siendo la respuesta superior en los animales infestados y reinfestados (Me2). Finalmente, y de una forma similar a lo hallado al valorar la respuesta IgG, en la raza Manchega la respuesta fue muy escasa.

a

dpi Grupo	-10	7	14	28	63	105	126	140
C2	0	0,052	0,078	0,11	0,118	0,223	0,177	0,148
C1					0	0,045	-0,096	-0,088
Ch2	0	-0,054	-0,027	0,065	0,103	0,139	0,212	0,209
Ch1					0	0,004	-0,039	-0,037
Me2	0	0,033	0,046	0,094	0,108	0,178	0,161	0,105
Me1					0	-0,003	0,002	-0,006
Ma2	0	0,009	0	-0,087	-0,073	-0,073	-0,058	-0,013
Ma1					0	0,148	0,072	0,127

b

dpi Grupo	-10	7	14	28	63	105	126	140
C2	0	0,131	0,175	0,171	0,149	0,32	0,369	0,266
C1					0	0,014	-0,103	-0,151
Ch2	0	-0,008	0,033	0,073	0,212	0,216	0,202	0,166
Ch1					0	0,033	-0,054	-0,098
Me2	0	0,142	0,051	0,218	0,208	0,269	0,17	0,127
Me1					0	0,034	-0,032	-0,015
Ma2	0	0,065	0,09	0,04	0,119	0,123	0,052	0,017
Ma1					0	0,129	0,017	0,014

Tabla I. Respuesta IgG1 de los animales pertenecientes a las cuatro razas ovinas estudiadas infestados experimentalmente con la dosis de prueba (grupo 1) o bien con las dos dosis empleadas (grupo 2) frente a ESA (a) y ESL (b).

a

dpi Grupo	-10	7	14	28	63	105	126	140
C2	0	-0,06	-0,026	-0,029	0,019	0,096	0,071	0,076
C1					0	0,017	-0,027	-0,064
Ch2	0	0	-0,011	0,008	0,076	0,116	0,058	0,038
Ch1					0	-0,026	-0,022	-0,05
Me2	0	-0,024	-0,053	-0,063	-0,034	0,078	0,048	0,008
Me1					0	0,121	0,043	0,006
Ma2	0	0,003	-0,017	-0,032	-0,018	0,055	0,049	-0,045
Ma1					0	0,121	0,051	0,007

b

dpi Grupo	-10	7	14	28	63	105	126	140
C2	0	-0,59	0,033	0,038	0,015	0,075	0,067	0,049
C1					0	0,024	0,064	-0,047
Ch2	0	-0,027	-0,022	-0,007	0,01	0,053	0,003	-0,016
Ch1					0	-0,023	-0,051	-0,095
Me2	0	0,033	-0,011	0,002	0,009	0,082	0,041	0,011
Me1					0	0,083	0,023	-0,011
Ma2	0	-0,018	-0,02	-0,02	-0,035	-0,01	-0,01	-0,069
Ma1					0	0,089	0,035	0,006

Tabla II. Respuesta IgG2 de los animales pertenecientes a las cuatro razas ovinas estudiadas infestados experimentalmente con la dosis de prueba (grupo 1) o bien con las dos dosis empleadas (grupo 2).

3.1.2.a.2. Respuesta IgG₂

La respuesta IgG₂ se estudió en las cuatro razas ovinas empleando en los ensayos ambos extractos solubles (ESL y ESA). La respuesta hallada en todos los animales fue muy escasa a lo largo de la experimentación con una cierta independencia de los tratamientos recibidos. Se observó en todas las razas un cierto incremento en los valores de A405, relacionado con el aumento de edad de los individuos empleados en los experimentos, frente a ESA, mientras que en los ELISA en los que se utilizó extracto soluble de L-3 dicha situación no fue observada (Tabla II).

3.1.2.b. Respuesta IgM

Los niveles de inmunoglobulinas de tipo M anti-**Haemonchus** se estudiaron en todos los animales semanalmente, al igual que en los casos anteriores. Las variaciones halladas fueron escasas en todas las razas y grupos experimentales. Sin embargo, en los animales de raza manchega infestados y reinfestados (Ma2) la respuesta IgM anti-ESL fue ligeramente superior a la observada en el resto de los individuos de esta raza, particularmente al final de la experimentación (Figs. 9 a 12a y b).

3.1.2.c. Respuesta IgA sérica anti-**Haemonchus**

La respuesta IgA sérica anti-**Haemonchus** de los animales sometidos a las infestaciones experimentales se muestra en las Figuras 13 a 16a y b, correspondientes a los ELISA empleando como fuente antigénica ESL y ESA respectivamente. De una forma general los valores de A405 obtenidos al emplear ESL fueron superiores a los hallados con extracto antigénico de adultos de **H. contortus** (ESA) a excepción de los animales de raza Merina, en los que se obtuvo una mejor respuesta con ESA. La respuesta IgA anti-**Haemonchus** fue dependiente de la dosis infestante utilizada ya que no se observaron incrementos notables tras la administración de 200 L3/Kg p.v. (Grupo 2) -a excepción de la raza Merina con ESA-, mientras que la dosis de prueba con 400 L3/Kg p.v. (Grupos 1 y 2) provocó elevaciones significativas en las razas estudiadas -hasta 0.3 en

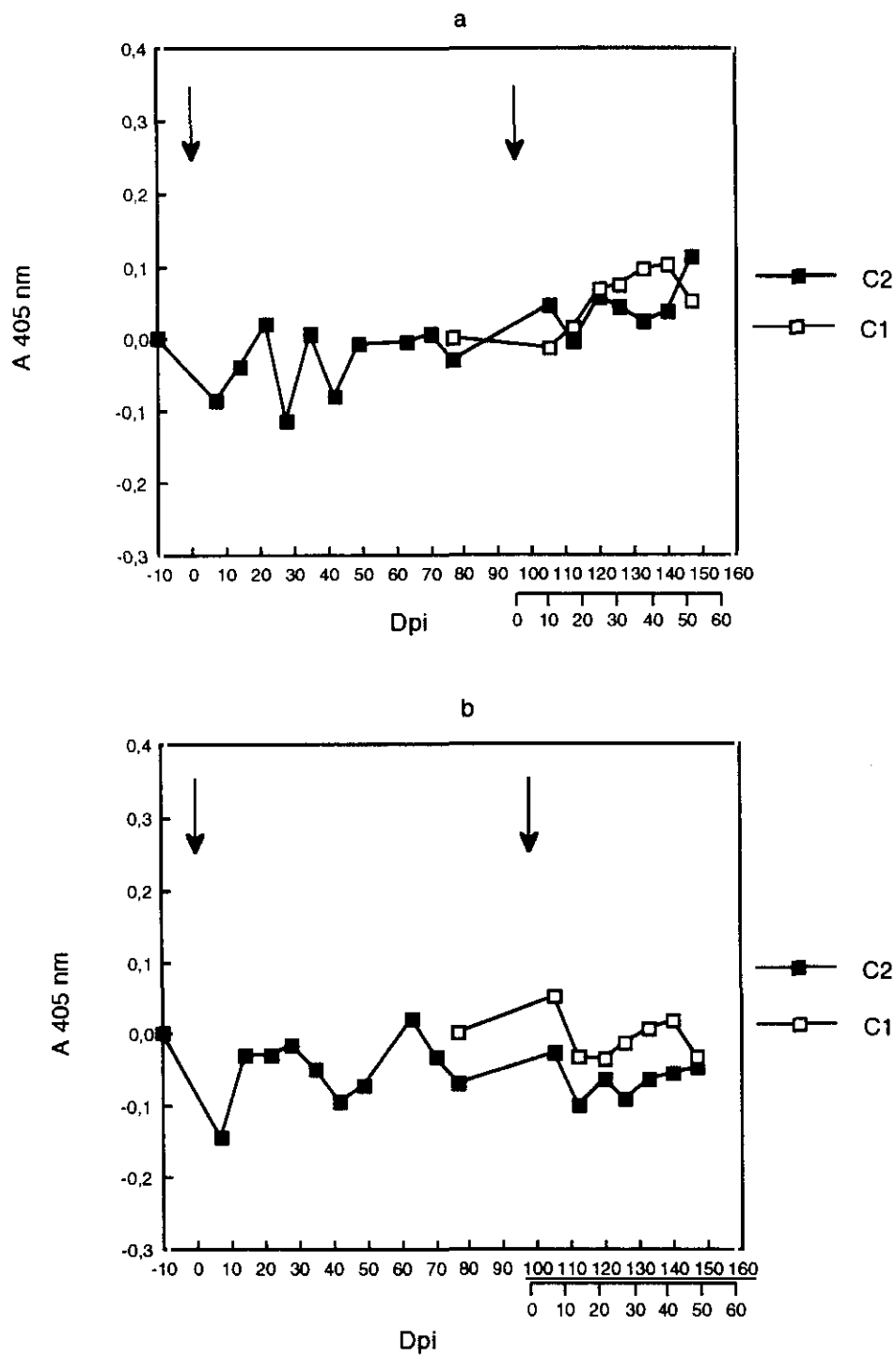


Figura 9. Anticuerpos de tipo M específicos anti-extracto soluble de adultos (a) y L3 (b) a lo largo de la experimentación correspondientes a los animales de raza Castellana.

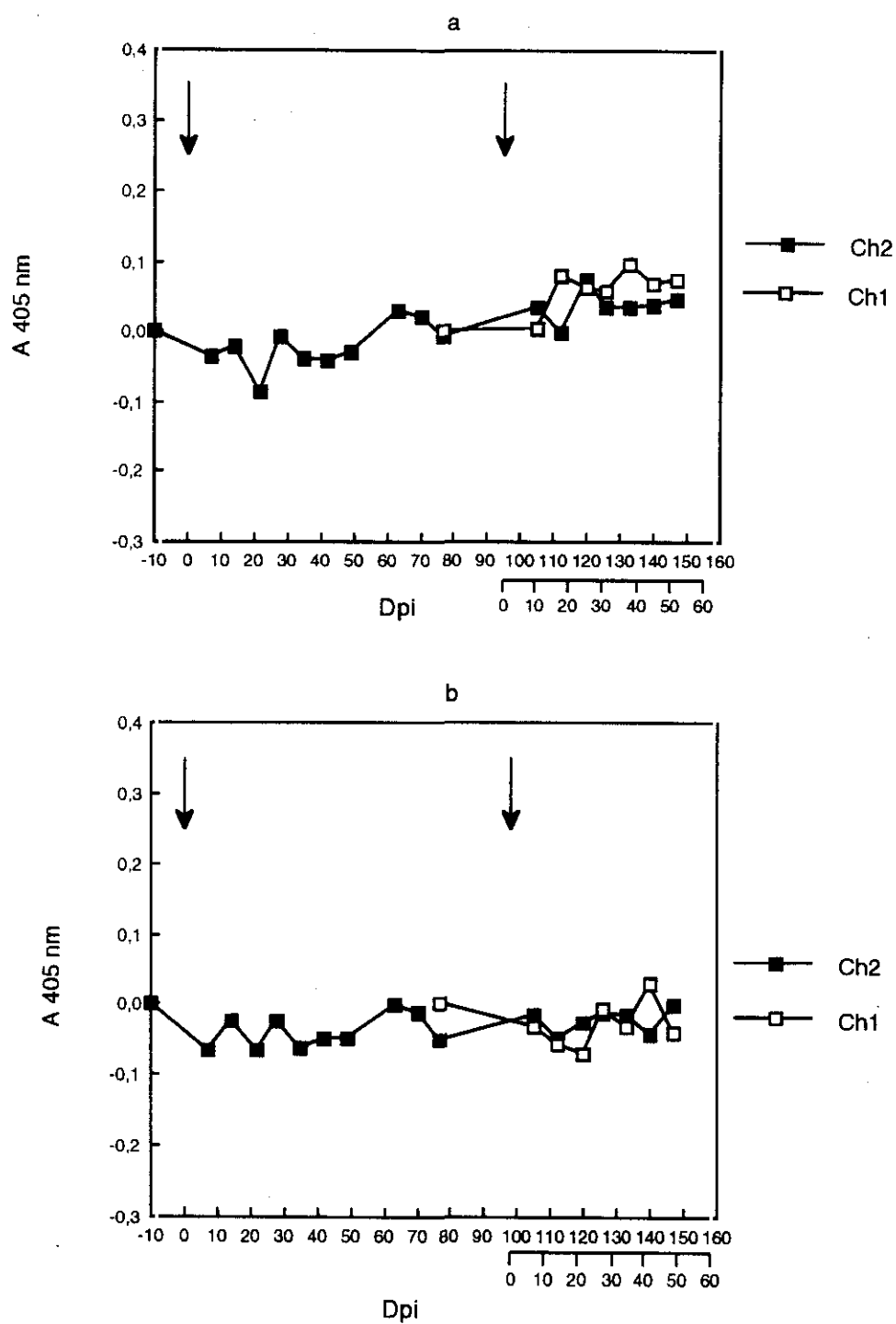


Figura 10. Anticuerpos de tipo M específicos anti-extracto soluble de adultos (a) y L3 (b) a lo largo de la experimentación correspondientes a los animales de raza Churra.

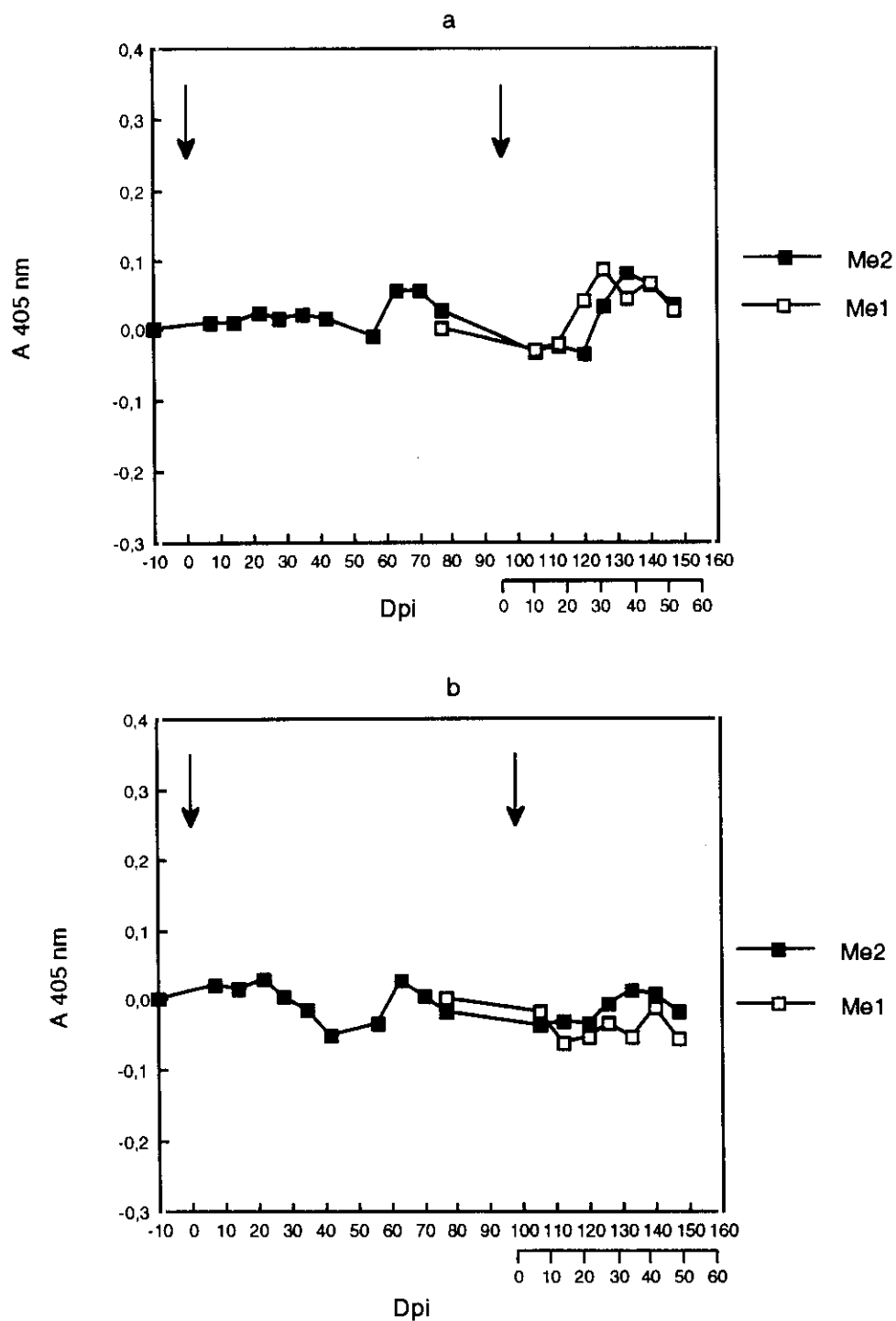


Figura 11. Anticuerpos de tipo M específicos anti-extracto soluble de adultos (a) y L3 (b) a lo largo de la experimentación correspondientes a los animales de raza Merina.

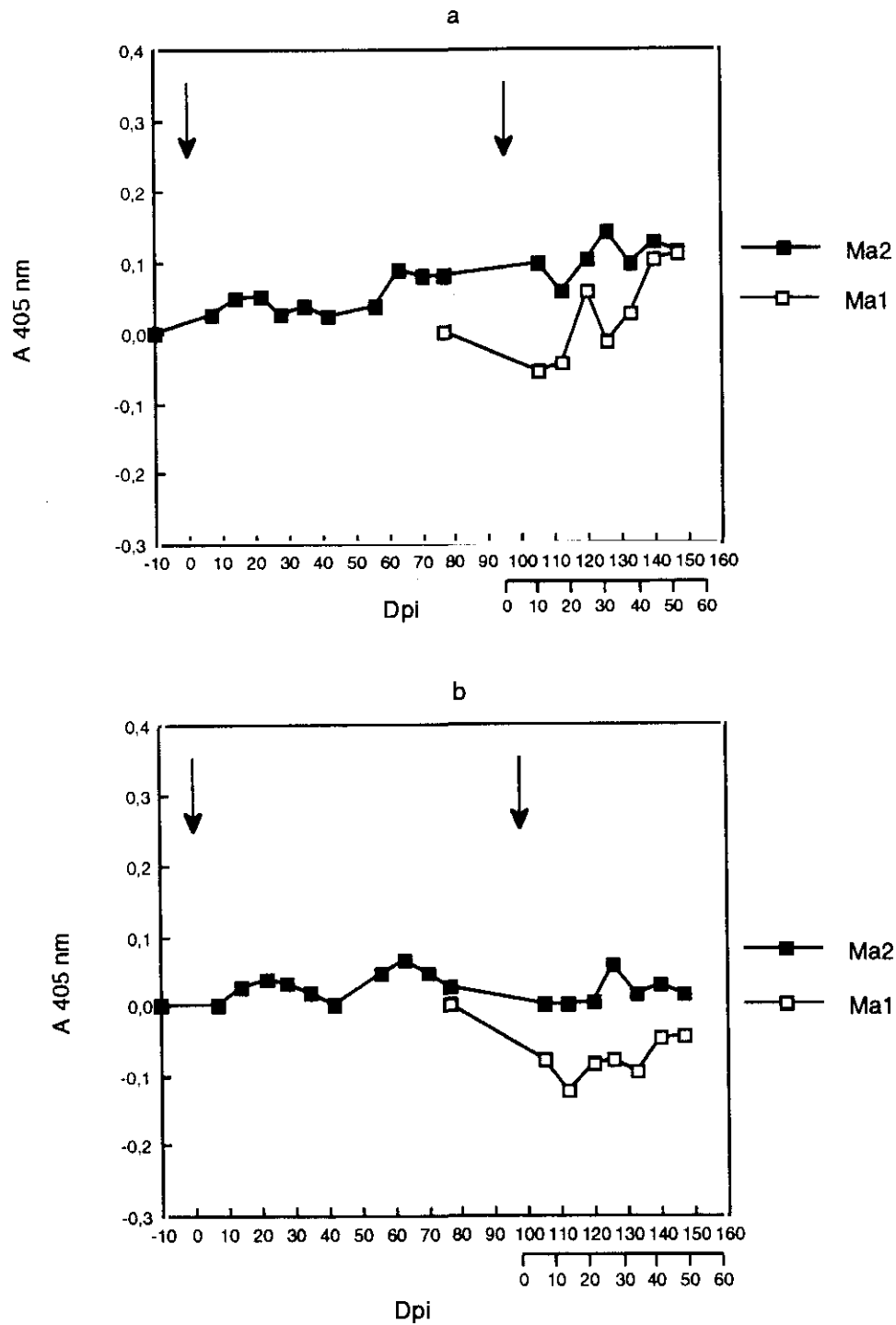


Figura 12. Anticuerpos de tipo M específicos anti-extracto soluble de adultos (a) y L3 (b) a lo largo de la experimentación correspondientes a los animales de raza Manchega.

algunos casos-. A pesar de esta aparente relación dosis-respuesta, en las razas Castellana y, especialmente, Merina los valores de IgA anti-**Haemonchus** fueron claramente superiores en los animales que habían sido sometidos previamente a la primoinfestación (Me2).

Las Figuras 13a y b muestran la respuesta de los animales de raza Castellana a lo largo del periodo experimental. Se observó una clara respuesta en los animales durante la segunda infestación, ligeramente superior en los infestados y reinfestados (C2) frente a ESL, mientras que la primoexposición no provocó ninguna respuesta significativas tanto frente a ESL como frente a ESA. El incremento de anticuerpos IgA anti-ESA apareció en el suero de los animales pertenecientes a los grupos C2 y C1 a partir del día 14 de la infestación con la dosis de prueba, seguido de una ligera disminución de los niveles de anticuerpos durante la patencia. Aunque no se halló una típica respuesta secundaria, la elevación en los animales infestados y reinfestados (C2) se adelantó 1 semana respecto a los resultados obtenidos en los animales que sólo sufrieron la dosis de prueba (C1).

La imagen obtenida en la raza Churra (Figuras 14a y b) con los dos extractos antigénicos resultó similar, con elevaciones de los niveles de anticuerpos a partir de la prepatencia (día 14 p.i.) de la dosificación con 400 L3/Kg p.v. en los grupos Ch1 y Ch2. Las inmunoglobulinas frente a adultos del parásito resultaron ligeramente mayores en el grupo Ch2 si exceptuamos el día 14 de la infestación, donde se produjo una marcada elevación en las IgA anti-adulto en el grupo Ch1. Los niveles de IgA detectados frente a ESL resultaron similares en ambos grupos de animales infestados, con la particularidad de dos picos de anticuerpos detectados en el grupo Ch1 en los días 14 y 35 postinfestación con la dosis de prueba. También en este caso, al igual que sucedía con la raza Castellana (**vide supra**), la respuesta desencadenada pareció dependiente de la dosis infestante recibida, puesto que no se observó ninguna elevación notable en las IgA séricas durante la primoinfestación (200 L3/Kg p.v.) ni se hallaron diferencias entre los valores de Ch1 y Ch2 tras la dosis de prueba. La dinámica temporal no permitió apreciar una mayor rapidez de la respuesta frente a ESL.

En la raza Merina se pudieron observar netas diferencias en la magnitud de la respuesta originada frente a los antígenos empleados (ver Figuras 15a y b). La imagen que representa la producción de IgA frente al ESA nos muestra una elevación de IgA anti-**Haemonchus** al final de la infestación con 200 L3/Kg p.v.

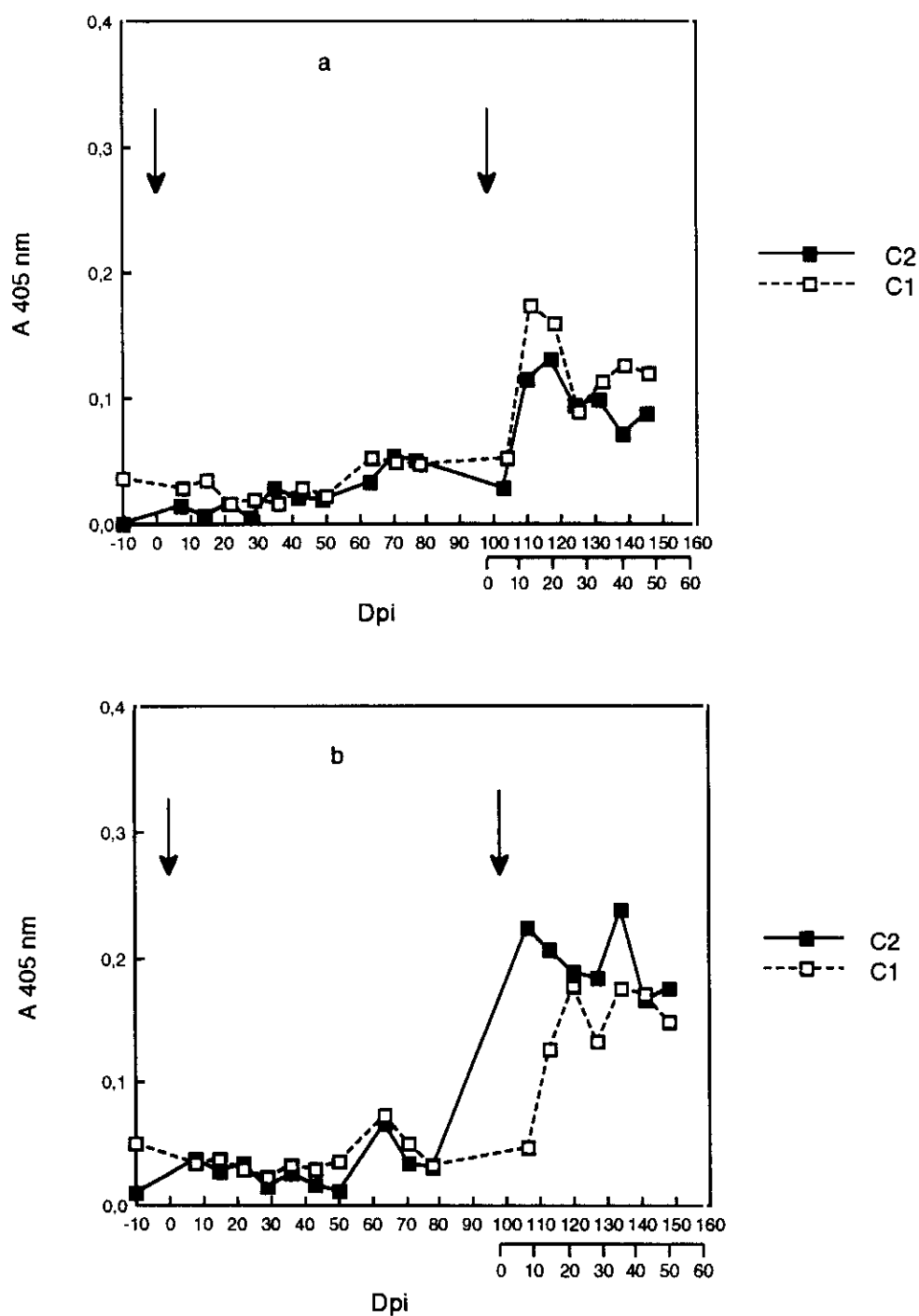


Figura 13. Anticuerpos de tipo A específicos anti-extracto soluble de adultos (a) y L3 (b) a lo largo de la experimentación correspondientes a los animales de raza Castellana.

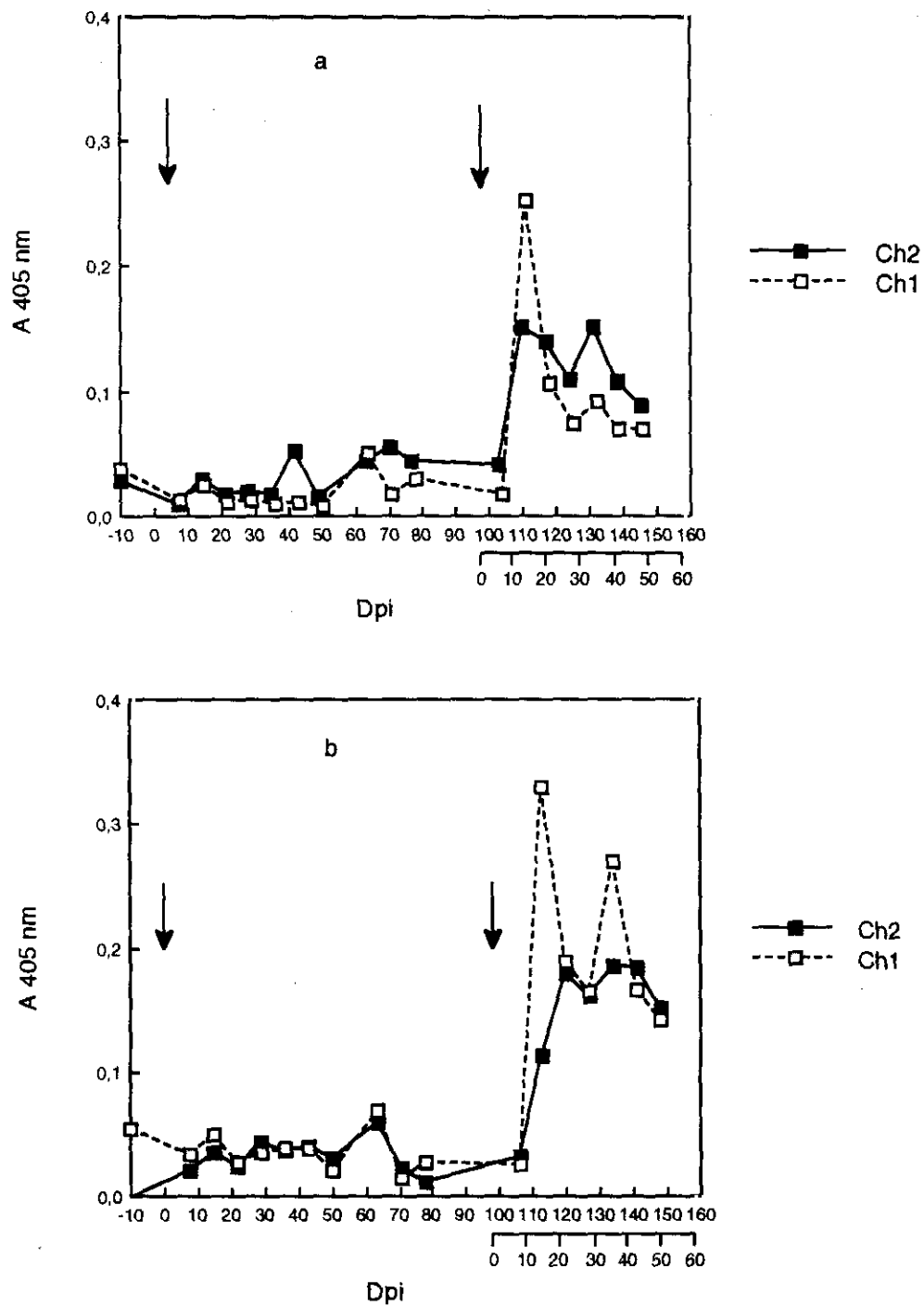


Figura 14. Anticuerpos de tipo A específicos anti-extracto soluble de adultos (a) y L3 (b) a lo largo de la experimentación correspondientes a los animales de raza Churra.

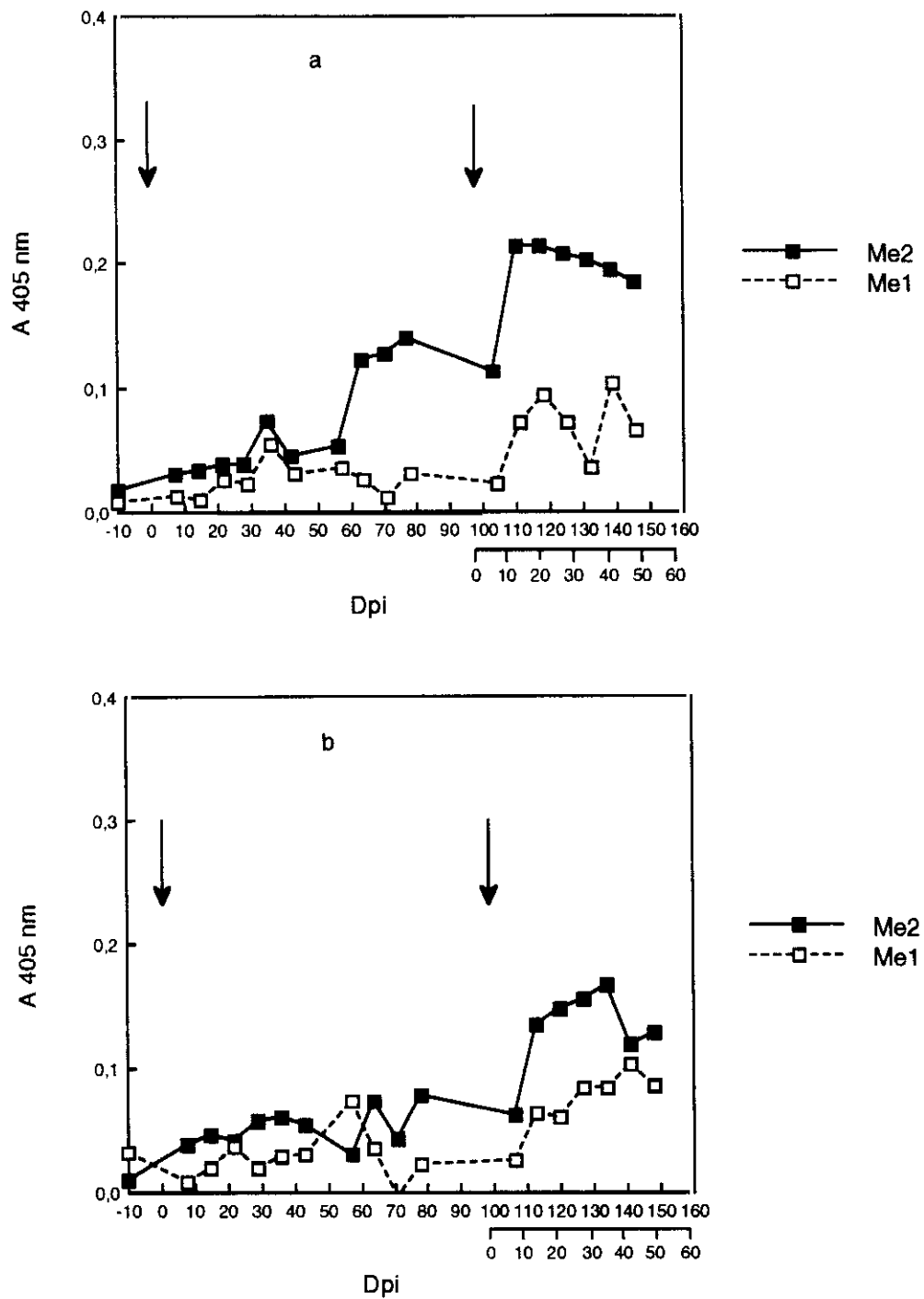


Figura 15. Anticuerpos de tipo A específicos anti-extracto soluble de adultos (a) y L3 (b) a lo largo de la experimentación correspondientes a los animales de raza Merina.

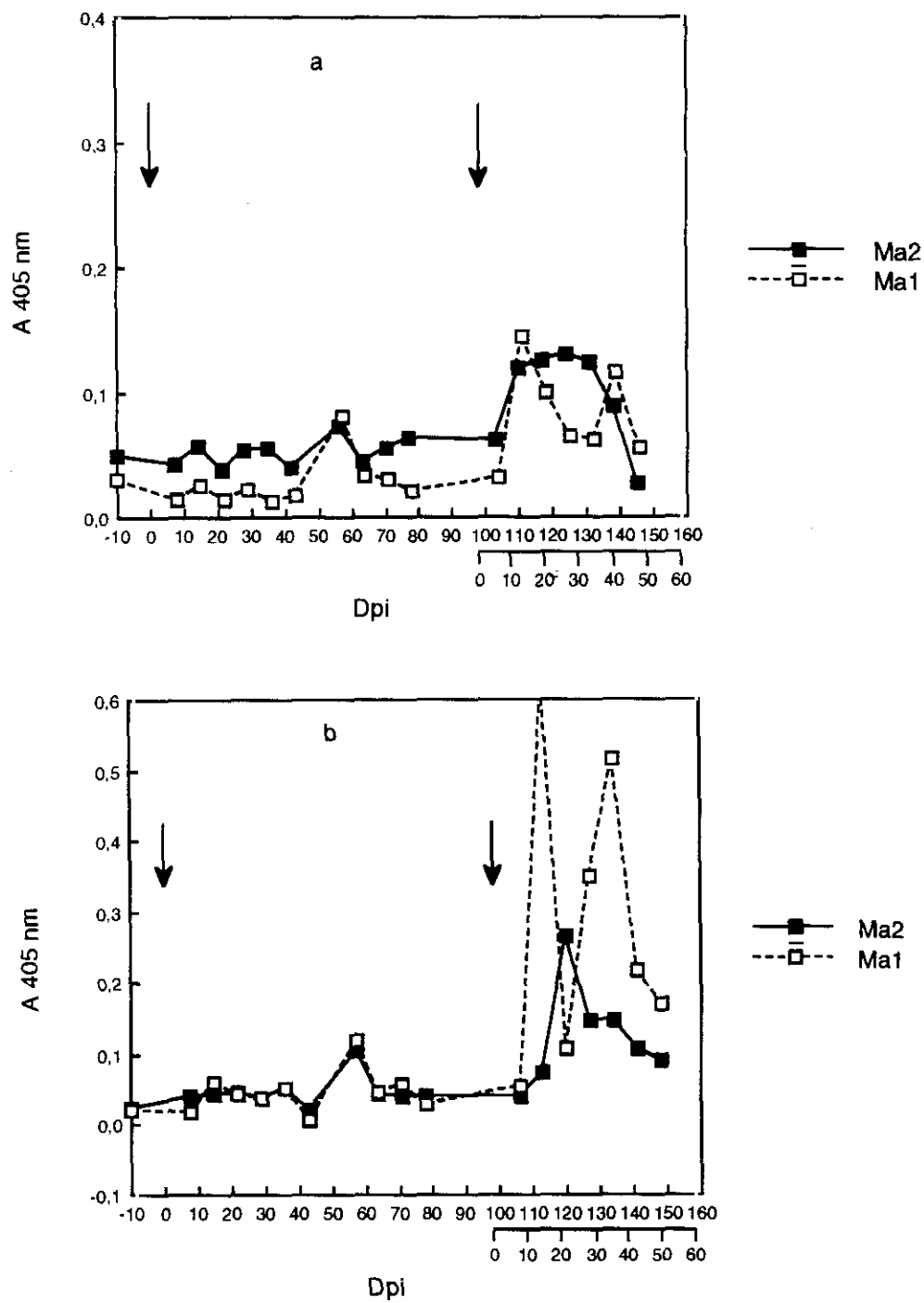


Figura 16. Anticuerpos de tipo A específicos anti-extracto soluble de adultos (a) y L3 (b) a lo largo de la experimentación correspondientes a los animales de raza Manchega.

en el grupo Me2. Este incremento constante de inmunoglobulinas coincidió con el descenso en la eliminación fecal de huevos del parásito en las tres hembras merinas del mencionado grupo experimental (**vide supra**). Asimismo, a partir del día 14p.i. con la dosis de prueba, el grupo Me2 manifestó de nuevo una elevación de los anticuerpos frente a ESA, que fue siempre superior al hallado en el grupo Me1 durante toda la prueba. El perfil de IgA anti-**Haemonchus** frente a ESL guardó una similitud con el obtenido frente a ESA, pero los niveles de IgA séricos resultaron mucho menos evidentes. También en este caso el grupo Me2 mostró mayores niveles de inmunoglobulinas que el grupo Me1.

En las Figuras 16a y b se muestra la respuesta obtenida en los grupos experimentales de raza Manchega. En los dos casos estudiados las elevaciones de IgA específica únicamente fueron detectables a lo largo de la segunda infestación tanto frente a ESA como ESL. La respuesta originada frente al extracto de adultos resultó débil respecto a la raza Merina, pero tanto el grupo Ma2 como el grupo Ma1 reconocieron los antígenos solubles de adulto del parásito a partir del día 14 de la dosis de prueba. Los niveles de IgA sérica anti-**Haemonchus** específica hallados frente a ESL en el grupo Ma1 fue la mayor respecto al resto de razas y grupos experimentales, mostrando en ocasiones incrementos en los niveles de IgA anti-L3 de 0.6 D.O. (día 14 p.i.). Los niveles de IgA anti-L3 mostrados por el grupo Ma2 fueron menores que los detectados en las demás razas, hallándose el valor máximo en el día 21 de la infestación con 400 L3/Kg p.v.

3.1.3. Carga parasitaria en abomaso

3.1.3.a. Tasa de establecimiento de **H.contortus** y número de vermes en abomaso

Tasa de establecimiento:

El análisis de los resultados obtenidos en el estudio de la adecuación **H.contortus**-razas ovinas empleadas se realizará teniendo en cuenta la tasa de implantación, considerando los vermes recuperados fuese cual fuese su estadio de desarrollo: número de adultos y número de L4 de la mucosa gástrica.

De una forma general, la tasa de establecimiento, expresada como porcentaje de implantación de la dosis infestante administrada, fue baja (ver Tabla

Illa y b). Al comparar los valores medios de los grupos de animales primoinfestados de las diferentes razas, se pudo observar que el mayor porcentaje de establecimiento correspondió a la raza Churra (Ch1) con un 17,6%, mientras que la Manchega (Ma1) mostró el valor medio más bajo (4,1%). El grupo Me1, a su vez, mostró un valor discreto de establecimiento (5,5%), y, por último, la implantación lograda en los animales castellanos primoinfestados (9,4%) fue intermedia. Las diferencias observadas entre las razas en las primoinfestaciones, tras su análisis, no fueron estadísticamente significativas, ni analizando los valores dos a dos ("t" de Student) ni en pruebas de homogeneidad (χ^2).

Cabe destacar la gran influencia que demostró, sobre la implantación, el contacto previo con el parásito. La reducción observada al comparar los animales primoinfestados y los que sufrieron dos infestaciones resultó cercana al 85% en todas las razas, excepto en la Merina, en la que sólo se logró un 60% de reducción en la implantación en aquellos animales previamente expuestos al parásito. Las reducciones en la implantación parasitaria resultaron especialmente significativas en las razas Churra y Castellana ($P < 0,05$) (CH2-CH1; C2-C1).

Los animales de diferente sexo mostraron gran disparidad en los porcentajes de implantación de vermes. Cabe destacar la diferencia tan significativa ($P < 0,01$) encontrada, de nuevo, entre los animales hembras y machos del Grupo 2 merino (Me2). No obstante, el número de animales excluye las conclusiones.

Número de vermes:

El número de vermes adultos recuperados de los animales en el momento del sacrificio mostraron grandes variaciones individuales intrarraciales, así como en dependencia de la raza ovina estudiada, el número de infestaciones que el animal había recibido y, en algún caso, del sexo de los hospedadores. Los valores, que aparecen reflejados en las Tablas IIIa y b, oscilaron entre 0% (animales nº 30,38 y 41 pertenecientes al grupo Me2) y 32,14% (animal nº 25 perteneciente al grupo Ch1).

Los valores medios en el número total de adultos hallados en los animales primoinfestados se resolvieron en tres grupos, que correspondieron a Merinos y

Raza	Nº Animal	Hembras	Machos	Adultos	% Dosis
Castellana	1	1,85	1,79	2,11	0,67
	7	1,04	1,04	1,32	0,48
	14	2,08	1,91	2,3	1,11
	5	2,05	2,08	2,64	1,54
	8	2,79	2,56	2,99	3,3
		1,96±0,56	1,88±0,49	2,28±0,56*	1,42±1,01*
Churra	17	3	2,05	3,05	5,82
	19	2,15	1,71	2,28	0,94
	24	2,8	2,36	2,94	4,81
	18	2,71	2,42	2,89	3,57
	23	2,05	1,49	2,15	1,53
	28	2	2,21	2,41	1,86
		2,45±0,4	2,04±0,34	2,62 ±0,35	3,08±1,79*
Merina	30	0	0	0	0
	38	0	0	0	0,01
	41	0	0	0	0,01
	32	2,84	2,76	3,1	5,89
	40	2,69	2,7	3	4,24
	42	2,62	2,46	2,85	3,03
		1,36±1,36	1,32±1,32	1,49 ±1,49	2,2±2,34
Manchega	52	2,18	1,85	2,34	3,7
	54	1,49	1,49	1,79	1,5
	43	2	1,79	2,21	0,67
	50	1,85	0	1,85	0,54
		1,88±0,25	1,28±0,75	2,04± 0,24*	1,61±1,29

Tabla IIIa. Número de vermes adultos (machos, hembras y valor total) transformados ($\log x+1$) recogidos en la necropsia, así como porcentaje de establecimiento correspondiente a los animales que sufrieron dos infestaciones (grupo 2). (*) Diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) entre los grupos 2 y 1 de cada raza.

Raza	Nº Animal	Hembras	Machos	Adultos	% Dosis
Castellana	9	3,35	3,17	3,57	17,28
	13	3,14	2,81	3,31	11,33
	2	2,94	2,38	3,05	4,71
	4	2,8	2,71	3,06	4,35
		3,06±0,21	2,77±0,28	3,24±0,22*	9,42±5,32*
Churra	15	1,79	2,08	2,26	1,06
	20	3,1	2,61	3,21	10,66
	25	3,64	3,58	3,92	32,15
	26	3,5	3,52	3,81	26,71
		3,01±0,73	2,95±0,63	3,28±0,66	17,6±12,4*
Merina	33	2,76	2,72	3,04	8,1
	34	0	1,32	1,32	0,18
	29	3,05	2,99	3,32	8,69
	37	2,78	2,61	3	4,96
		2,15±1,25	2,41±0,64	2,67±0,23	5,48±3,37
Manchega	47	2,23	1,61	2,32	1,52
	51	2,61	2,15	2,74	2,97
	46	3,07	3,09	3,38	9,14
	55	2,77	0,3	2,9	3,2
		2,67±0,3	1,79±1,01	2,84±0,38*	4,21±2,92

Tabla IIIb. Número de vermes adultos (machos, hembras y valor total) transformados ($\log x+1$) recogidos en la necropsia, así como porcentaje de establecimiento correspondiente a los animales que sufrieron una sola infestación (grupo 1).

Manchegos (alrededor de 1000 vermes) por un lado, Castellanos (2005 vermes) por otra parte y por último los animales de raza Churra (4110 vermes adultos). Aunque posteriormente se analizará la relación machos/hembras de **H. contortus**, debemos indicar que los números absolutos de helmintos de los dos sexos siguieron un patrón similar respecto a la adecuación que se ha señalado anteriormente. Así, el número medio de hembras recogidas **postmortem** en los animales primoinfestados, mostró valores similares entre las razas Merina y Manchega (alrededor de 600 vermes). La raza Castellana exhibió valores intermedios (1280 vermes), a la vez que los animales de raza Churra aparecieron, de nuevo, como los más susceptibles (2198 vermes). En el caso de los machos de **H. contortus**, los animales siguieron la misma pauta de comportamiento que en los valores detectados para las hembras del parásito, aunque las cifras fueron ligeramente inferiores.

A pesar de las diferencias observadas en los valores medios, la gran variación individual fue responsable de que no se apreciaran diferencias significativas estadísticamente entre los grupos C1, Ch1, Me1 y Ma1, empleando "t" de Student y pruebas de homogeneidad (X²), con los números absolutos o con los valores transformados ($\log (x+1)$).

Aunque se hallaron grandes variaciones individuales, el estudio realizado mostró diferencias estadísticamente significativas en algunas razas cuando se compararon los grupos que habían sido sometidos a una reinfestación con los que sólo estuvieron en contacto en una ocasión con **H. contortus**. Estas diferencias, expresión de la capacidad de respuesta protectora frente al helminto, se tradujeron en descensos notables en todos los casos en el número de vermes adultos recuperados en los abomasos tras la necropsia. En general, la reducción fue proporcional a la relación machos/hembras del helminto, aunque en los grupos Ch2 y Ma2, la población de vermes machos fue la que experimentó el porcentaje de disminución más notable.

Los grupos de animales que sufrieron dos infestaciones (grupo 2) redujeron los valores (de machos, hembras o adultos totales) entre un 80 y un 90% respecto a los animales de su misma raza que recibieron una única dosis de larvas infestantes (grupo 1), con la excepción de los animales de raza Merina, en los que sólo se consiguieron descensos del 53% en todos los casos. Teniendo en cuenta la gran variabilidad, los números fueron transformados ($\log (x+1)$) previamente a su análisis estadístico. Empleando "t" de Student, las diferencias

observadas fueron estadísticamente significativas ($P<0,05$) en las razas Castellana (C2-C1) y Manchega (Ma2-Ma1) cuando se consideró el número de adultos.

Los dos sexos de animales estudiados dentro de cada grupo experimental siguieron un comportamiento similar al hallado en el porcentaje de establecimiento. Existieron diferencias significativas entre los dos sexos en las razas Castellana (número de hembras en C2, $P<0,05$) y Churra (número de machos, número total de adultos y número total de vermes en Ch1, $P<0,01$). Se encontraron, de igual modo, diferencias muy significativas ($P<0,01$) entre hembras y machos del grupo Me2, (número de hembras, número de machos, número total de adultos y número total de vermes), ya que las hembras no permitieron el establecimiento de ningún parásito adulto.

Se consideró importante el estudio de la población larvaria en la mucosa gástrica, tanto como expresión de la adecuación **H.contortus**-hospedador ovino en los animales sometidos a una primoinfestación, como de la respuesta inmunitaria en los animales infestados y reinfestados y las posibles diferencias raciales o sexuales. Las larvas recuperadas de la mucosa se encontraron en estadio de L4 inicial y los valores numéricos en los animales experimentales se muestran en la Tabla IV. Se encontraron animales en los que no se apreció ningún tipo de inhibición del desarrollo larvario y, por el contrario, individuos con una marcada tendencia a la detención de desarrollo.

Los animales de raza Manchega mostraron una mayor cantidad de larvas en la mucosa respecto al resto de las razas, tanto en las primoinfestaciones como en las reinfestaciones, alcanzando valores de hasta 465 vermes inmaduros. Al igual que en el caso de la población adulta, teniendo en cuenta la dispersión numérica, los recuentos fueron transformados ($\log(x+1)$) y analizados posteriormente mediante "t" de Student dos a dos, tanto en el estudio de la resistencia en las infestaciones y reinfestaciones de cada raza, como en el estudio de las variaciones interraciales.

Las razas Castellana y Merina (C1-Me1) se comportaron de una forma similar, aunque otras comparaciones mostraron la existencia de diferencias significativas (C1-Ma1; Ch1-Me1) ($P<0,05$) o muy significativas (Ch1-Ma1) ($P<0,01$).

Raza	Nº Animal (Grupo 2)	Nº Larvas	Nº Animal (Grupo 1)	Nº Larvas
Castellana	1	1,11	9	0,48
	7	1,9	13	0
	a	14	2	0,48
	5	1,26	4	0,95
	8	0,6		
		1,29±0,44*		0,48±0,34* d*
Churra	17	1,63	15	0
	19	0,78	20	0
	b	24	25	0,3
	18	1,11	26	0
	23	2,34		
	28	1,86		
		1,56±0,5**		0,1±0,1** c*d**
Merina	30	0	33	0,3
	38	0,3	34	1,04
	c	41	29	0,78
	32	0	37	0,3
	40	0,48		
	42	0,85		
		0,32±0,29		0,61±0,32 b*
Manchega	52	2,67	47	1,67
	54	2,37	51	1
	d	43	46	0,7
	50	1,85	55	1,46
		2,04±0,24		1,2±0,38 a*b**

Tabla IV. Número de larvas inhibidas encontradas en la mucosa del abomaso en la necropsia de los animales infestados. Diferencias estadísticamente significativas (* $P<0,05$; ** $P<0,01$) entre los grupos 2 y 1 de las distintas razas. Los diferentes superíndices muestran las diferencias significativas entre distintos grupos experimentales.

Dentro de la raza Manchega observamos diferencias importantes en el grupo experimental 2 entre machos y hembras, mostrando estas últimas una mayor tendencia a provocar detención en el desarrollo larvario ($350,5 \pm 114,5$ L4 frente a $44,5 \pm 24,5$ L4 detectadas en los machos). En el grupo C2 apareció reflejada, a su vez, mayor cantidad de L4 en las hembras ($43,3 \pm 27$) que en los machos ($10 \pm 9,9$), mientras que en el grupo Ch2 se encontró la situación opuesta ($30,7 \pm 18,2$ L4 en las hembras **versus** $100 \pm 86,2$ L4 en los machos). La existencia de este patrón tan variable así como la ausencia de diferencias destacables en el resto de grupos experimentales parecen sugerir que el número de animales de diferente sexo fue insuficiente para extraer conclusiones.

De mayor relevancia resultaron las diferencias halladas en el número de L4 en la mucosa gástrica en dependencia del estado inmunitario de los individuos. En general, al comparar los animales con exposiciones previas al parásito frente a aquéllos que no contactaron anteriormente con **H. contortus**, los primeros incrementaron su capacidad de provocar inhibición del desarrollo larvario en valores cercanos al 90%. La excepción la constituyó el grupo de los merinos, no demostrando una clara capacidad de respuesta para producir hipobiosis. El análisis, mediante "t" de Student de los valores transformados ($\log(x+1)$) mostró la existencia de diferencias significativas entre C2 y C1 ($P < 0,05$) y, especialmente, Ch2 y Ch1 ($P < 0,01$) respecto al número de L4 en la mucosa.

3.1.3.b. Grado de desarrollo parasitario de **H.contortus**

3.1.3.b.1. Longitud de vermes adultos

Como una estimación del grado de adecuación entre el ganado ovino estudiado y el aislado de **H.contortus** empleado en la experimentación se estudió el grado de desarrollo alcanzado por los helmintos en el abomaso de sus hospedadores. Se empleó, según se ha señalado en el Capítulo de Material y Métodos, la longitud total de Adultos y L4 como medida del desarrollo corporal.

En la tabla V se muestran las medidas correspondientes a la longitud de los vermes adultos recogidos **postmortem**. Los valores oscilaron entre 9,9 mm (animales nº 26 y 52) y 11,9 mm (animales nº 46 y 47) para los machos, y entre 15,3 mm (animal nº 52) y 20,7 mm (animal nº 15) para las hembras.

Grupo	H. contortus (mm hembras)	H. contortus (mm machos)
C2	15,76±0,39	11±0,26
C1	17,67±0,48	11,15±0,55
Ch2	16,64±0,79	11±0,4
Ch1	18,22±1,54	10,83±0,71
Me2	17,84±0,22	11,23±0,3
Me1	18,07±1,17	10,93±0,3
Ma2	16,71±1,21	10,29±0,31
Ma1	19,04±0,44	11,36±0,35

Tabla V. Longitud de **H. contortus** adultos recogidos en la necropsia (media ± desviación estándar).

Las medidas obtenidas fueron similares entre las distintas razas ovinas, no detectándose diferencias notables entre los grupos C1, Ch1 y Me1. Sin embargo, las diferencias fueron significativas ($P < 0,05$) al estudiar la longitud de las hembras de **H. contortus** en los dos grupos de animales primoinfestados que poseían los valores más extremos, esto es, Castellana 1 (C1) (17,67 mm) y Manchega 1 (M1) (19,04 mm).

Los animales con previa experiencia de la infestación homóloga mostraron una tendencia clara a la disminución de la longitud de los vermes recuperados en el estudio **postmortem**. En la raza Manchega, existieron diferencias significativas entre las medidas de los vermes recuperados de los animales primoinfestados y reinfestados (Ma2) y los sometidos únicamente a la dosis de prueba (Ma1) y tanto en la longitud de las hembras ($P < 0,05$) como los machos ($P < 0,01$) de **H. contortus**. En el resto de las razas también se observó esta característica, especialmente en el caso de las hembras del parásito, a pesar de lo cual no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

Se hallaron variaciones importantes en los valores de longitud de las hembras del parásito cuando se analizaron por separado machos y hembras ovinas dentro de cada grupo experimental. Las diferencias más notables correspondieron a los grupos C2 y Ma2 en los que los valores detectados en las corderas (138 ± 39 mm en C2 y $159,8 \pm 6,9$ mm en Ma2) fueron inferiores a los detectados en los machos ($182,4 \pm 12,3$ mm en C2 y $174,4 \pm 10$ mm en Ma2). Asimismo, las hembras del grupo Me1 mostraron valores inferiores ($172,6 \pm 2,7$ mm) a los machos del mismo grupo (197 mm). Lo contrario sucedió en el grupo Ch1, en el que se produjeron valores superiores en las hembras del grupo ($195,3 \pm 11,4$ mm) respecto a los detectados en los machos ($169,1 \pm 1,8$ mm).

3.1.3.b.2. Longitud de L4

En la figura 17 se muestra un ejemplo gráfico demostrativo de las diferencias morfológicas encontradas entre los vermes recogidos, que en algunos casos nos permitió reconocer su sexo, especialmente en el caso de las hembras (vulva rudimentaria en el tercio distal del verme y en el mismo lateral en el que se encontraba el ano).



Figura 16. Larvas de cuarto estadio recogidas de la mucosa de abomaso de los animales que fueron infestados con la dosis de prueba

Grupo	H. contortus (L4 μ m)
C 2	1306,68 \pm 104,98
C 1	1341,67 \pm 112,42
Ch 2	1445,86 \pm 64,99
Ch 1	nd
Me 2	1551,04 \pm 522,81
Me 1	1263,23 \pm 37,34
Ma 2	1308,37 \pm 84,66
Ma 1	1393,82 \pm 97,7

Tabla VI. Larvas de cuarto estadio halladas en la necropsia de los animales infestados de los distintos grupos experimentales (media \pm desviación estándar).

La determinación de la longitud de las L4 se realizó en todos los vermes recogidos. Se encontraron valores extremos para las L4 entre 800 μm (animal nº 52) y 2425 μm (animal nº 54), aunque, en general, no existieron variaciones importantes entre los valores medios calculados. En la tabla VI se muestran los valores medios en μm , así como las desviaciones correspondientes a la longitud de las larvas. Los más elevados correspondieron a las L4 recogidas del grupo Me2, mientras que las menores medidas se encontraron en los vermes recogidos del grupo Me1. El escaso número de larvas recogidas de la mucosa en estos dos grupos, nos impidieron establecer comparaciones entre ellos.

3.1.3.c. Biomasa parasitaria y peso medio de los vermes

3.1.3.c.1. Biomasa parasitaria:

Debido a las dificultades técnicas sólo se determinó el peso seco correspondiente a los vermes adultos de **H. contortus**. En la Tabla VII se muestran los valores obtenidos en los animales sacrificados, diferenciando los pesos secos de los machos y hembras adultos, así como la biomasa parasitaria total de adultos. A pesar de la gran diversidad hallada, comparando los valores medios de los distintos grupos experimentales, encontramos diferencias importantes entre ellos. Los valores más elevados de hembras adultas (463,8 mg), machos adultos (193,25 mg) o peso total de adultos de **H. contortus** (657,07 mg), correspondieron siempre al grupo Ch1, seguidos de los grupos C1, Ma1 y Me1, en orden decreciente. En este sentido, la raza Churra se mostró como la más receptiva a las primoinfestaciones por **H. contortus**, a la vez que la Merina apareció como la más resistente de forma natural junto con los animales de raza Manchega. La raza Castellana tuvo un comportamiento intermedio.

Aunque las diferencias encontradas entre las distintas razas, al estudiar los animales sometidos a una primoinfestación, fueron importantes en algunos casos (657,06 mg total Ch1 **versus** 167,98 mg total Me1), no se pudo demostrar significación estadística.

De mayor significación fueron los resultados obtenidos en dependencia de la experiencia inmunitaria de los ovinos infestados. Los animales sometidos a una infestación previa con el parásito (Grupo 2) mostraron una capacidad efectiva para

reducir la biomasa parasitaria respecto a los animales que únicamente recibieron la dosis de prueba (Grupo 1). Al estudiar la biomasa correspondiente a las hembras del parásito, comprobamos que el mayor porcentaje de reducción tuvo lugar en la raza Manchega (87,4%). Las razas Churra y Castellana, a su vez, reaccionaron de forma evidente (82% y 70,3% de disminución respectivamente), comprobándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los grupos 1 y 2 en ambas razas.

Los resultados correspondientes a la biomasa de los machos del parásito fueron similares a los hallados en el caso de las hembras, aunque existieron mayores porcentajes de disminución. En este caso, la reducción más notable la alcanzó el grupo Ch2 (92%) respecto al grupo Ch1. Se encontraron valores comparables en los animales del grupo 2 correspondientes a las razas Manchega (91,5% de reducción) y Castellana (76,9%). Los animales pertenecientes a la raza Merina, de forma similar a lo que ocurrió en el caso de las hembras de **H. contortus**, mostraron discretos descensos del peso parasitario (45,8%).

Las reducciones de la biomasa total parasitaria, al comparar los dos grupos experimentales (Grupos 1 y 2), siguieron un patrón muy similar al hallado en las hembras, relacionado con el hecho de ser éstas las que mayor contribución aportan a la biomasa total parasitaria.

De forma general, los porcentajes de reducción en la biomasa parasitaria resultaron estadísticamente significativos en aquellas razas que más sensibles se mostraron de forma natural a las infestaciones por el parásito (Churra y Castellana). La raza Merina que apareció como la más resistente al establecimiento parasitario, resultó ser la que menor porcentaje de reducción parasitaria logró, a pesar de que las tres hembras pertenecientes al grupo Me2 fueron casi refractarias a la reinfestación.

Al igual que en el resto de parámetros considerados anteriormente, las diferencias encontradas entre los dos sexos que componían cada grupo experimental no mostraron un claro patrón en todas las razas estudiadas. Las tendencias fueron similares al estudiar el peso correspondiente a machos, hembras o peso total parasitario. En la raza Castellana se hallaron valores en las corderas primoinfestadas superiores a los hallados en los machos del mismo grupo ($462,9 \pm 138,7$ mg total parasitario **versus** $216,53 \pm 20,63$), encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). Este hecho se tornó en el

RAZA	Nº ANIMAL	H.contortus (mg hembras)	H.contortus (mg machos)	H. contortus (mg total)
Castellana	1	14	7	21
	7	nd	nd	nd
	14	26	7	33
	5	110	13	123
	8	168,95	38,92	207,87
		63,79 ± 65,07*	13,18 ± 13,51	76,97 ± 77,77
Churra	17	185	5	190
	19	30	4	34
	24	152,78	25,76	178,54
	18	100,1	29	129,1
	23	18	nd	nd
	28	15	13,87	28,87
		83,48 ± 67,36*	12,94 ± 11,06	94,42 ± 72,08
Merina	30	0	0	0
	38	0	0	0
	41	0	0	0
	32	158,7	57	215,7
	40	127,4	50	177,4
	42	145,95	26	171,95
		72,01 ± 72,58	22,17 ± 24,07	94,17 ± 95,17
Manchega	52	37	7	44
	54	7	1,5	8,5
	43	19	6	25
	50	10	0	10
		18,25 ± 11,69	3,63 ± 2,94	21,88 ± 14,31

Tabla VIIa. Biomasa parasitaria en mg (machos, hembras y valor total de **H. contortus**) hallada en la necropsia de los animales infestados en dos ocasiones (grupo 2). Media ± desviación estándar. (*) Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre grupo 1 y 2 de cada raza.

RAZA	Nº ANIMAL	H. contortus (mg hembras)	H. contortus (mg machos)	H. contortus (mg total)
Castellana	9	451,58	150	601,58
	13	264,1	60,13	324,23
	2	213,15	24	237,15
	4	144,9	51	195,9
		268,4 ± 113,8*	71,28 ± 47,35	339,7 ± 158,1
Churra	15	23	13	36
	20	323,68	48	371,68
	25	812,15	384	1196,15
	26	696,43	328	1024,43
		463,8 ± 312*	193,3 ± 164,4	657,1 ± 472,4
Merina	33	116	55,9	171,9
	34	0	2	2
	29	194,25	55,78	250,03
	37	198	50	248
		127,1 ± 80,3	40,92 ± 22,6	168 ± 100,9
Manchega	47	42	7	49
	51	118	13	131
	46	298,35	130,2	428,6
	55	120,88	20	140,9
		144,8 ± 94,1	42,55 ± 50,8	187,4 ± 143,7

Tabla VIIb. Biomasa parasitaria en mg de **H. contortus** (machos, hembras y valor total) hallada en la necropsia de los animales infestados en una sólo ocasión (grupo 1). Media ± desviación estándar.

grupo C2 (27 ± 6 mg total en las hembras y $165,4 \pm 42,4$ mg total en los machos). En las razas Churra y Manchega las ovejas primoinfestados se mostraron más resistentes de forma natural a la infestación ($203,8 \pm 167,8$ mg; 90 ± 41 mg Ch1 y Ma1 respectivamente) que los machos ($1110,3 \pm 85,9$ mg; $284,7 \pm 143,8$ mg Ch1 y Ma1). Se halló significación estadística en las diferencias entre ambos sexos de animales del grupo Ch1 ($P < 0,05$) cuando se consideraron los mg de machos adultos de **H. contortus** hallados en la necropsia. En los grupos de animales que sufrieron dos infestaciones en las razas Churra y Manchega no se encontraron diferencias destacables, a pesar de que en las hembras se encontraron valores ligeramente más altos que en los machos ovinos.

Las diferencias encontradas entre los dos sexos de animales de raza Merina sí fueron más notables y de difícil interpretación. Las hembras se mostraron en todo momento más resistentes a las infestaciones por **H. contortus** (87 ± 85 mg total en las hembras frente a 249 ± 1 mg total en los machos del grupo Me1), si bien la disimilitud resultó dramática en el grupo Me2, encontrándose diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) en la biomasa parasitaria (mg de machos, hembras y totales parasitarios) entre ambos sexos.

3.1.3.c.2. Peso medio de los vermes

Los resultados obtenidos al estimar el peso medio de los vermes adultos (machos y hembras) fueron, en general, uniformes. En la tabla VIII aparecen reflejados los pesos medios correspondientes a los vermes adultos obtenidos tras el sacrificio del ganado ovino infestado. Los grupos de raza Churra y Manchega infestados únicamente con la dosis de prueba (Grupo 1) mostraron los mayores valores medios, tanto en los machos ($106,4$ y $118,2$ μg respectivamente) como en las hembras ($264,6$ y $248,7$ μg respectivamente) de **H. contortus**, frente a los obtenidos en las razas Castellana y Merina ($98,1$ y $96,7$ μg en machos y $216,9$ y 235 μg en hembras del parásito) con una sola infestación.

El número de infestaciones que sufrieron los animales, estudiada dentro de cada raza, afectó ligeramente al valor medio del peso del verme. Los animales pertenecientes al grupo Ch2 ocasionaron una disminución de un 18,1% en el de los machos y un 27,7% en el peso medio de las hembras del parásito respecto al grupo Ch1. Por su parte, los animales manchegos que sufrieron dos infestaciones

Grupo	H. contortus ($\mu\text{g/hembra}$)	H. contortus ($\mu\text{g/macho}$)
C 2	258,23 \pm 56,2	105,15 \pm 10,76
C 1	216,88 \pm 21,75	98,13 \pm 3,25
Ch 2	191,32 \pm 30,72	87,13 \pm 24,5
Ch 1	264,58 \pm 74,52	106,35 \pm 7,06
Me 2	279,12 \pm 49,85	96,55 \pm 4,88
Me 1	235 \pm 67,95	96,74 \pm 23,99
Ma 2	203,21 \pm 40,66	83,33 \pm 23,57
Ma 1	248,69 \pm 29,54	118,21 \pm 33,07

Tabla VIII. Peso medio parasitario de los machos y hembras de **H. contortus** en los diferentes grupos experimentales (media \pm desviación estándar).

Raza	Nº animal (grupo 2)	Hembras/ Machos	Fertilidad	Nº Animal (grupo 1)	Hembras/ Machos	Fertilidad
Castellana	1	1,17	11,91	9	1,49	5,22
	7	1	11,67	13	2,14	3,85
	14	1,5	5,42	2	3,63	5,15
	5	2,67	9,43	4	1,24	9,18
	8	1,72	6,16			
		1,61±0,6	8,91±2,7		2,12±0,9	5,85±2
Churra	17	9,09	5,07	15	0,5	13,06
	19	2,8	3,93	20	2,95	4,77
	24	2,74	3,76	25	1,14	1,92
	18	2	2,5	26	0,95	2,37
	23	3,67	3,18			
	28	0,63	6,82			
		3,49±2,7	4,21±1,4		1,39±0,9	5,53±4,5
Merina	30	nd	nd	33	1,11	3,62
	38	nd	nd	34	nd	nd
	41	nd	nd	29	1,14	4,61
	32	1,21	6,19	37	1,46	6,53
	40	0,98	5,17			
	42	1,45	4,76			
		1,22±0,2	5,38±0,6		1,24±0,2	4,92±1,2
Manchega	52	2,14	2	47	4,25	14,21
	54	1	nd	51	2,93	9,19
	43	1,67	9,17	46	0,94	7,12
	50	nd	3,1	55	2,95	5,23
		1,6±0,5	4,75±3,2		2,77±1,2	8,94±3,4

Tabla IX. Valor de la relación Hembras/macho de los vermes recogidos en la necropsia de los animales. Asimismo se muestra la fertilidad calculada para las hembras del parásito.

(Ma2) redujeron el peso medio parasitario de los machos y hembras del verme (18,3% y 29,5% respectivamente) cuando se les comparó con los animales manchegos infestados con la dosis de prueba. Los animales de raza Castellana y Merina mostraron un comportamiento opuesto.

Las diferencias halladas entre los dos sexos de animales dentro de cada grupo experimental variaron en función de la raza estudiada, y sólo fueron notables algunos valores correspondientes a las hembras de **H. contortus**.

3.1.3.d. Relación hembras/machos de **H. contortus**

En la tabla IX aparece reflejada la relación hembras/machos adultos de **H. contortus** recuperados del abomaso tras el sacrificio de los ovinos infestados. En general, el número de hembras superó al número de machos, aunque en algunos animales sucedió lo contrario (nº 11, 28, 15, 26, 40 y 46). El valor más alto correspondió al animal nº17 (9,09 hembras por cada macho presente) perteneciente al grupo Ch2. En los animales nº 34 y 50 no fue posible establecer la relación, ya que no se encontraron hembras de **H. contortus** en un caso o machos en el otro, respectivamente.

Al estudiar la diferencia interracial, los animales merinos y churros aparecieron con la relación hembras/machos más baja (1,24 y 1,39 respectivamente). Las otras dos razas mostraron relaciones superiores, especialmente los animales manchegos (2,77).

Se puede apreciar, a su vez, una ligera disminución de la relación en los grupos de animales sometidos a dos infestaciones respecto a los ovinos del Grupo 1. La mayor diferencia se observó entre los grupos Ma2 y Ma1, con reducciones del 42% en el índice. El grupo C2 mostró un discreto descenso (23%) en el valor medio hembras/machos respecto al grupo C1. La excepción se presentó en los animales de raza Churra, en los que se puede apreciar un valor relativo más alto del número de hembras de **H. contortus** en el grupo Ch2 (3,49) que en el grupo Ch1 (1,39). En general, no se detectaron diferencias importantes entre los dos sexos de animales de cada grupo experimental al estudiar la relación hembras/machos. Los valores más dispares aparecieron en el grupo Ch2, con un valor de $4,9 \pm 3$ en el caso de las hembras frente a $2,1 \pm 1,2$ en el caso de los machos del grupo.

3.1.3.e. Fertilidad de las hembras de **H.contortus**

La fertilidad de las hembras de **H.contortus** se calculó a partir de la eliminación fecal media de huevos (durante las 3 últimas determinaciones) y el número de hembras halladas en la necropsia. Los valores oscilaron entre 14,21 (animal nº47) y 1,92 (animal nº 25). Las menores variaciones dentro de cada grupo correspondieron a los animales de raza Merina, mientras que los manchegos mostraron una mayor dispersión, tanto dentro del grupo Ma2 como en el grupo Ma1.

Las hembras del parásito encontradas en los animales del grupo Ma1 fueron las que demostraron mayor capacidad de producción de huevos. Por su parte, los animales manchegos que recibieron dos infestaciones mostraron una capacidad de reducción en la fertilidad de las hembras del 46,8 % respecto a los animales manchegos del grupo 1. Asimismo, se encontró un ligero descenso en el valor medio del grupo Ch2 (23,9%) respecto al valor calculado en el grupo Ch1. La fertilidad en los dos grupos experimentales de animales merinos fue muy similar. La excepción se encontró en la raza Castellana donde se observó una mayor fertilidad en el grupo C2 que en el grupo C1.

No existieron diferencias destacables entre la fertilidad hallada en los dos sexos de animales, dentro de cada grupo experimental. Unicamente las hembras de los grupos Ch1 ($8,9 \pm 4,1$) y Ma1 ($11,7 \pm 2,5$) mostraron valores superiores a los machos de sus grupos respectivos ($2,1 \pm 0,2$ en Ch1 y $6,2 \pm 0,9$ en Ma1), sin que las diferencias fuesen muy notables.

3.1.4. Relación entre la eliminación fecal de huevos, títulos séricos y carga parasitaria (Adultos y L4)

3.1.4.1. Relación entre la carga parasitaria y la eliminación fecal de huevos

En las Figuras 18 a,b y c se muestra, gráficamente, la relación existente entre la eliminación fecal de huevos de **H.contortus** por parte de los ovinos infestados y la carga parasitaria en el abomaso. Se han representado gráficamente los valores absolutos medios (Fig. 18a); los valores absolutos de eliminación de huevos (hpg) y el valor transformado de los vermes adultos ($\log(x+1)$) (Fig. 18c) y los valores doblemente transformados (raíz cuadrada de hpg, $\log(x+1)$) (Fig. 18b).

En todos los análisis existió una clara correlación lineal entre ambos parámetros, aunque los mejores resultados se obtuvieron cuando se emplearon los datos transformados (Fig. 18b), con un valor de correlación $r=0,827$ ($r^2=0,684$). El valor de "r" indicó claramente la existencia de una relación directa entre los recuentos de hpg y la carga parasitaria.

3.1.4.2. Relación entre la respuesta IgG sérica y la carga parasitaria en abomaso

Se estudió la correlación existente entre respuesta IgG sérica anti-**Haemonchus** -empleando ambos extractos antigénicos, soluble larvario (ESL) y soluble de adultos del helminto (ESA)- y la carga parasitaria, tanto considerando los dos sexos de la población de vermes, el número de L4 y el total. Los análisis se realizaron considerando la posibilidad de variación interracial, así como la posible dependencia de la exposición previa a **H.contortus**. Los resultados de los análisis de correlación se muestran en la Tabla Xa, para el extracto antigénico de L3 (ESL), y en la Tabla Xb, para el extracto antigénico de adultos (ESA).

Con independencia de las correlaciones observadas respecto al número de machos y hembras adultas de **H.contortus**, en distintos grupos de ganado y con los dos extractos antigénicos (p.e. Ch2, nº de hembras, ESL) -posiblemente de

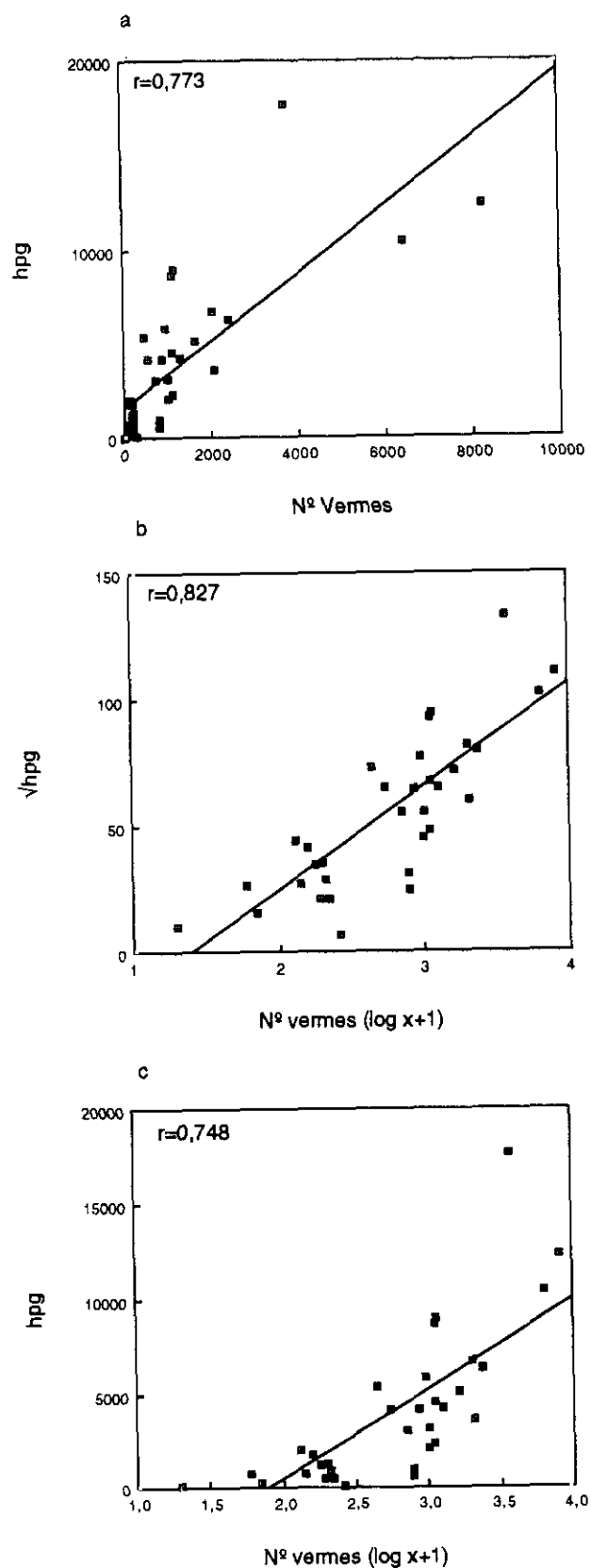


Figura 18. Relación entre la eliminación fecal de huevos de **H. contortus** y los vermes recogidos de abomaso (datos transformados-figs. b y c- y sin transformar-fig. a-).

log (x=1) <i>H. contortus</i>					
	Machos	Hembras	Adultos	L4	Total
Castellana	-0,248	-0,333	-0,316	0,656	-0,359
Churra	-0,417	-0,112	-0,211	-0,148	-0,253
Merina	-0,268	0,123	-0,315	-0,49	-0,862
Manchega	0,642	0,334	0,41	-0,054	0,624
C2	-0,051	-0,066	-0,066	0,4	-0,244
C1	0,681	0,476	0,577	0,318	0,577
Ch2	-0,043	0,736	0,58	-0,164	0,553
Ch1	-0,468	-0,47	-0,479		-0,479
Me2	0,176	-0,369	-0,71	-0,897	-0,988
Me1	-0,191	-0,214	-0,222	0,057	0,223
Ma2	-0,026	0,032	-0,063	0,9	0,598
Ma1	0,828	0,772	0,815	-0,497	0,843
grupo 2	-0,298	-0,073	-0,111	-0,365	-0,584
Grupo 1	0,162	0,094	0,043	-0,267	0,045
Todos	-0,138	-0,105	-0,106	-0,156	-0,451

Tabla X a. Relación entre la respuesta IgG anti-ESL y los vermes recogidos en la necropsia en los diferentes grupos experimentales.

log (x=1) <i>H. contortus</i>					
	Machos	Hembras	Adultos	L4	Total
Castellana	-0,283	-0,374	-0,353	0,712	-0,361
Churra	-0,747	-0,544	-0,629	0,489	-0,673
Merina	0,001	0,142	-0,054	-0,378	-0,732
Manchega	0,635	0,46	0,504	-0,221	0,522
C2	-0,514	-0,629	-0,598	0,39	-0,735
C1	0,414	0,289	0,342	0,584	0,342
Ch2	-0,188	0,608	0,428	-0,052	0,429
Ch1	-0,923	-0,809	-0,867		0,867
Me2	-0,204	-0,69	-0,438	-0,823	-0,904
Me1	0,095	0,186	0,045	0,156	0,05
Ma2	0,993	0,973	0,939	-0,206	0,027
Ma1	0,909	0,906	0,917	-0,573	0,931
grupo 2	-0,424	-0,304	-0,309	-0,315	-0,537
Grupo 1	0,213	0,109	0,164	-0,001	0,16
Todos	-0,14	-0,182	-0,119	-0,012	-0,345

Tabla X b. Relación entre la respuesta IgG anti-ESA y los vermes recogidos en la necropsia en los diferentes grupos experimentales.

carácter menos significativo al implicar un menor número de helmintos- el análisis se ceñirá esencialmente al nº de adultos (machos+hembras), nº de L4 y vermes totales.

Considerando conjuntamente todos los animales infestados no se pudo hallar ninguna correlación significativa entre la carga parasitaria (Adultos, L4) y la respuesta IgG sérica, con ninguno de los extractos antigénicos empleados (ESL, ESA). Cuando se analizaron los resultados interraciales, con independencia del tratamiento a que habían sido sometidos los animales (primoinfestación; primoinfestación + dosis de prueba) se observó que en la raza Castellana existió una correlación entre el nº de L4 inhibidas en la mucosa y la respuesta IgG sérica, tanto con ESA ($r=0,712$) como con ESL ($r=0,656$) no observada en ninguna de las otras razas ovinas, a excepción de una ligera correlación negativa en el ganado Merino.

El nº total de vermes sí estuvo relacionado con la respuesta anti-ESL en la raza Manchega ($r=0,624$). Esta correlación también existió, pero negativa, en los merinos tanto con ESL ($r=-0,862$) como con ESA ($r=-0,732$), situación también presente en la raza Churra con el extracto antigénico de adultos (ESA) ($r=-0,673$).

Analizando por grupos (Grupo 1: dosis de prueba; Grupo 2: primoinfestación + dosis de prueba), con independencia de la raza ovina estudiada, a pesar de que no existieron valores muy significativos, fue de destacar que en el caso de los animales del Grupo 2, la respuesta anti-ESL y anti-ESA de **H.contortus** estuvo correlacionada con el número total de vermes de forma más notable ($r=-0,584$ y $r=-0,537$, respectivamente), lo que evidenció una cierta dependencia entre la carga parasitaria y la respuesta sérica.

3.2. Aislamiento y caracterización de antígenos diagnósticos

Los estudios de aislamiento y caracterización de antígenos de potencial valor diagnóstico de la hemoncrosis ovina se llevaron a cabo a partir de los dos extractos antigénicos, ESL y ESA. Los ensayos comprendieron el fraccionamiento cromatográfico de las muestras (gel filtración, intercambio iónico), electroforético (SDS-PAGE), y el seguimiento se realizó mediante ELISA de las fracciones obtenidas e inmunodetección (Western blotting). Teniendo en cuenta el interés de

la presencia de residuos glucídicos en los péptidos aislados se determinaron glicoproteínas a partir de las separaciones electroforéticas realizadas.

3.2.1. Caracterización de ESL

El cromatograma obtenido a partir de la separación cromatográfica de ESL mediante gel filtración (Sephacryl S-200) se muestra en la Figura 19. Podemos observar dos picos mayoritarios de absorbancia, >150 kDa de peso molecular estimado el primero, y entre 150 y 20 kDa el segundo.

La cromatografía de intercambio iónico realizada con el ESL aparece reflejada en la Figura 20. En ella se muestran tres picos de absorbancia a 280 nm: "I1" o fracción no unida, seguida de dos picos que eluyeron con el gradiente denominados "I2" y "I3". Se llevaron a cabo enzimoimmunoensayos (ELISA) con las tres fracciones obtenidas, utilizando sueros de animales de 6 meses de edad infestados y reinfestados con **H. contortus** así como sueros de animales libres de parásitos. Cuando se estimó el índice positivos/negativos (P/N), resultante de la absorbancia obtenida con una fracción y sueros positivos (n=5) anti-**Haemonchus**/ absorbancia del ELISA con la misma fracción y sueros negativos (n=11) (ver sección 3.2.2.a), no se observó en ninguna de las fracciones la aparición de incrementos notables en el índice P/N. La fracción I1 mostró un índice alrededor de 1,4, mientras que en las fracciones I2 y I3 el índice resultó de 1,7 aproximadamente, valores todos ellos similares a los detectados con el ESL (1,5).

Se llevó a cabo una separación electroforética (SDS-PAGE) de las fracciones (Fig. 20) y se realizaron inmunodetecciones con los mismos sueros empleados en el caso anterior, no detectándose, en nuestras condiciones, ningún antígeno específico de **H. contortus** (no mostrado).

Teniendo en cuenta la falta de antígenos de interés diagnóstico en ESL y sus fracciones, la detección de glicoproteínas sólo se efectuó en el extracto total (ESL) (Fig. 21) tras su electroforesis (SDS-PAGE) y transferencia. En el ensayo se incluyeron controles positivo (transferrina), negativo (creatinasa). La mayoría de las glicoproteínas de ESL tenían un PM estimado > 67 kDa, con una intensa tinción en la parte superior de la electroforesis. Además, aparecieron numerosas bandas débiles entre 67 y 14 kDa.

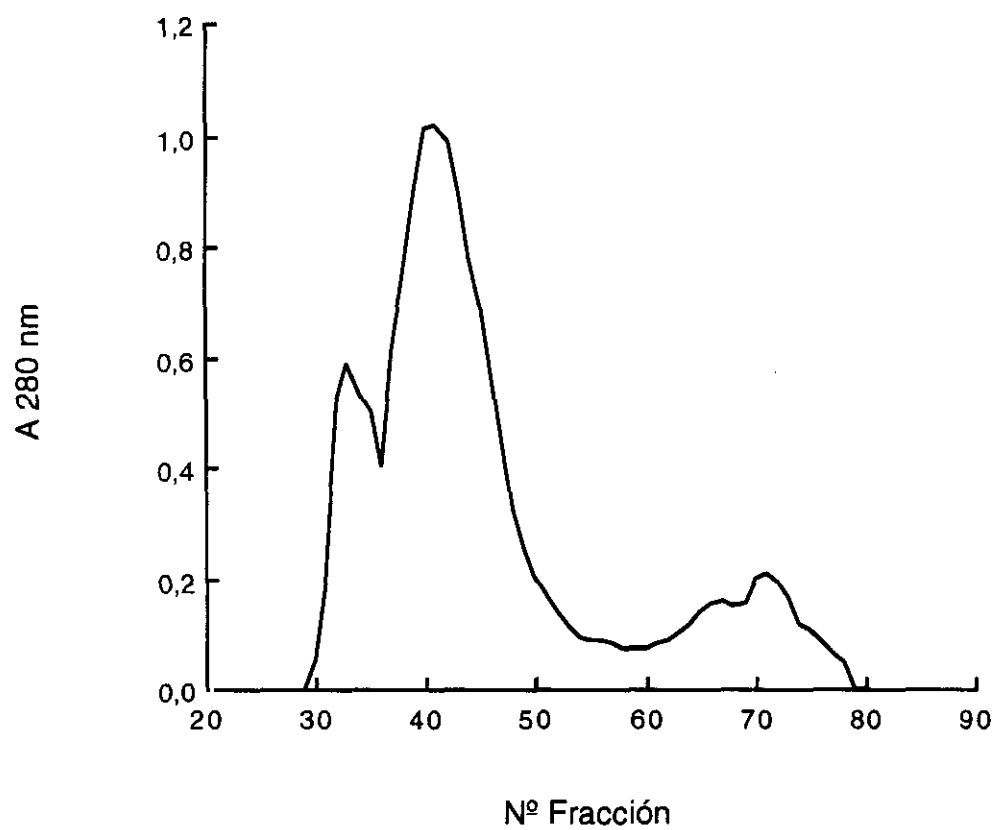


Figura 19. Perfil de elución del extracto soluble larvario en la cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-200).

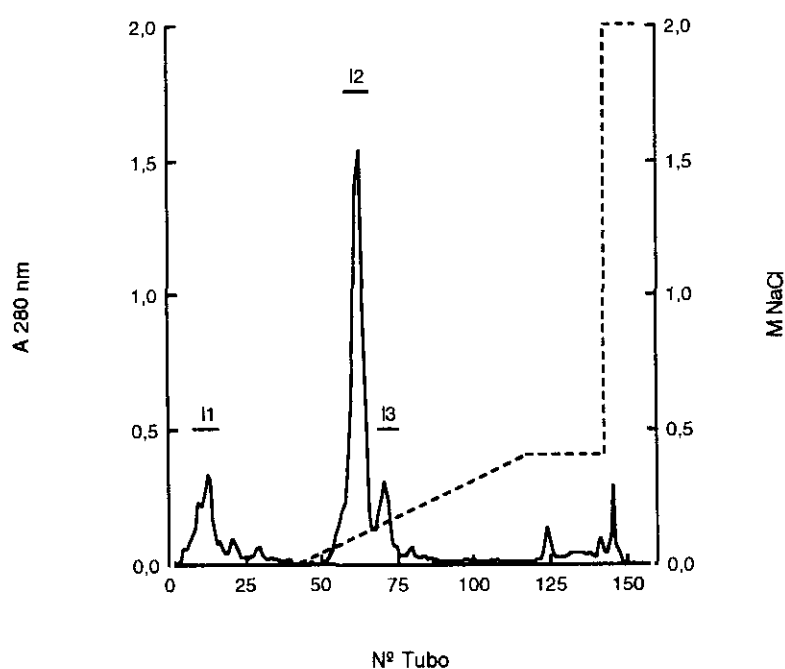
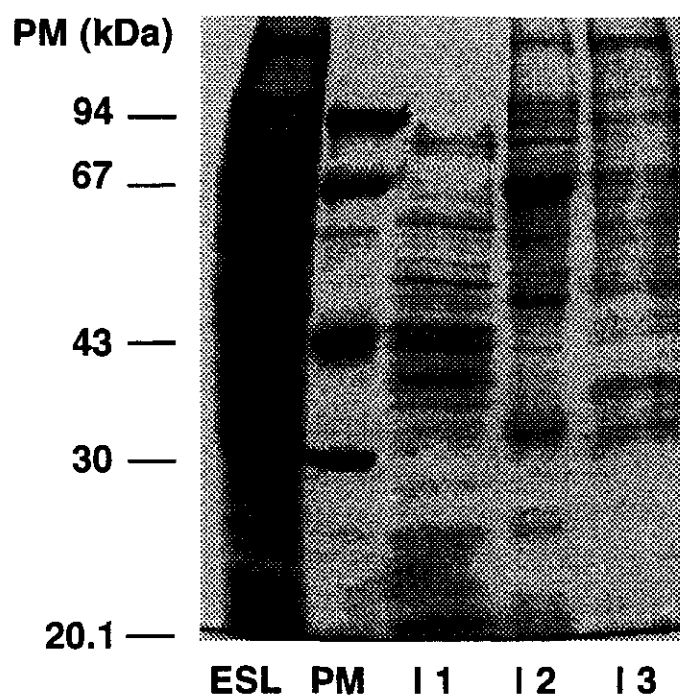


Figura 20. Perfil de elución del extracto soluble larvario (ESL) cuando se aplicó a un gel de intercambio iónico y se eluyó con un gradiente salino. Las Barras indican las regiones seleccionadas. En la electroforesis (12,5% acrilamida) se observa la separación proteica lograda en las fracciones (I1, I2 y I3), así como los marcadores de peso molecular.

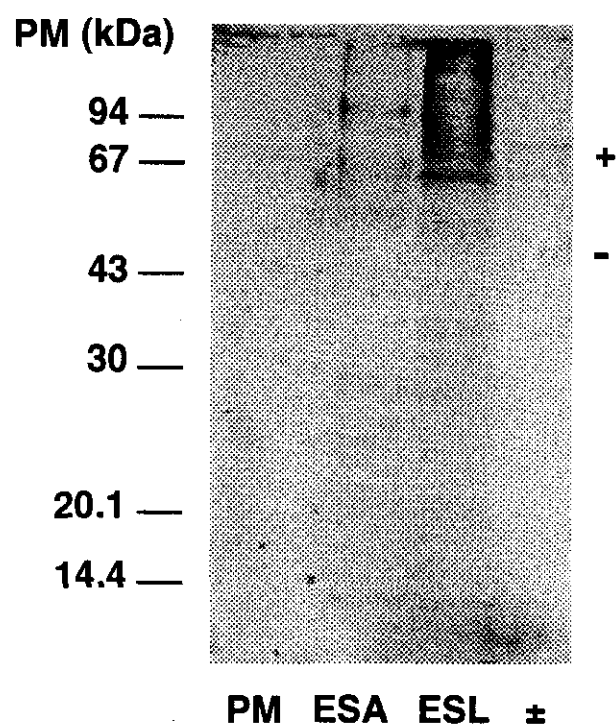


Figura 21. Detección de glicoproteínas realizada con el extracto soluble de adultos (ESA) y el extracto soluble larvario (ESL). Asimismo se introdujeron proteínas con (+, transferrina) y sin (-, creatinasa) residuos azucarados. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

3.2.2. Caracterización de ESA

3.2.2.a. Gel filtración con Sephacryl S-200

El perfil típico de elución de ESA obtenido en la cromatografía de exclusión molecular se muestra en la Figura 22. En el cromatograma se apreciaron dos picos mayoritarios de absorbancia, en las regiones de peso molecular aparente >200 kDa el primero y entre 78 y 42 kDa el segundo. Los tubos recogidos de la cromatografía se enfrentaron de forma individual en un ELISA a mezclas séricas de animales libres de infestación (n=11) así como de animales con infestaciones homólogas con **H. contortus** (n=5), o heterólogas con **Te. circumcincta** (n=2) y **T. colubriformis** (n=2). Se calculó el índice P/N a partir de las absorbancias obtenidas mediante la prueba inmunoenzimática, considerando como positivos todos los animales que sufrieron infestación homóloga o heteróloga (inserto Fig. 22).

Se halló una alta reactividad cruzada entre los sueros procedentes de animales infestados con **H. contortus** y **T. colubriformis**, especialmente en las fracciones de mayor peso molecular (>150 kDa), mientras que los animales infestados con **Te. circumcincta** no mostraron ninguna reactividad notable con ninguna de las fracciones. El mayor índice P/N se obtuvo entre las fracciones 36 a 41, correspondientes a PM de 150-78 kDa.

Las fracciones individuales correspondientes a los picos del cromatograma y los ELISA se mezclaron en 4 mezclas (A1, A2, A3 y A4), correspondientes a PM estimados de >200, 150-200, 78-150 y 42-78 kDa. La mezcla A4 fue la que evidenció un valor superior del índice P/N, además de una aceptable especificidad en el enzimoimmunoensayo (índice P/H). Las electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) de las fracciones individuales (32 a 49) (Fig. 23) mostraron que las comprendidas entre 41-49, zona de la cromatografía que incluía A4 (40-45), contenía una zona rica en péptidos desde 25 a 30 kDa de PM.

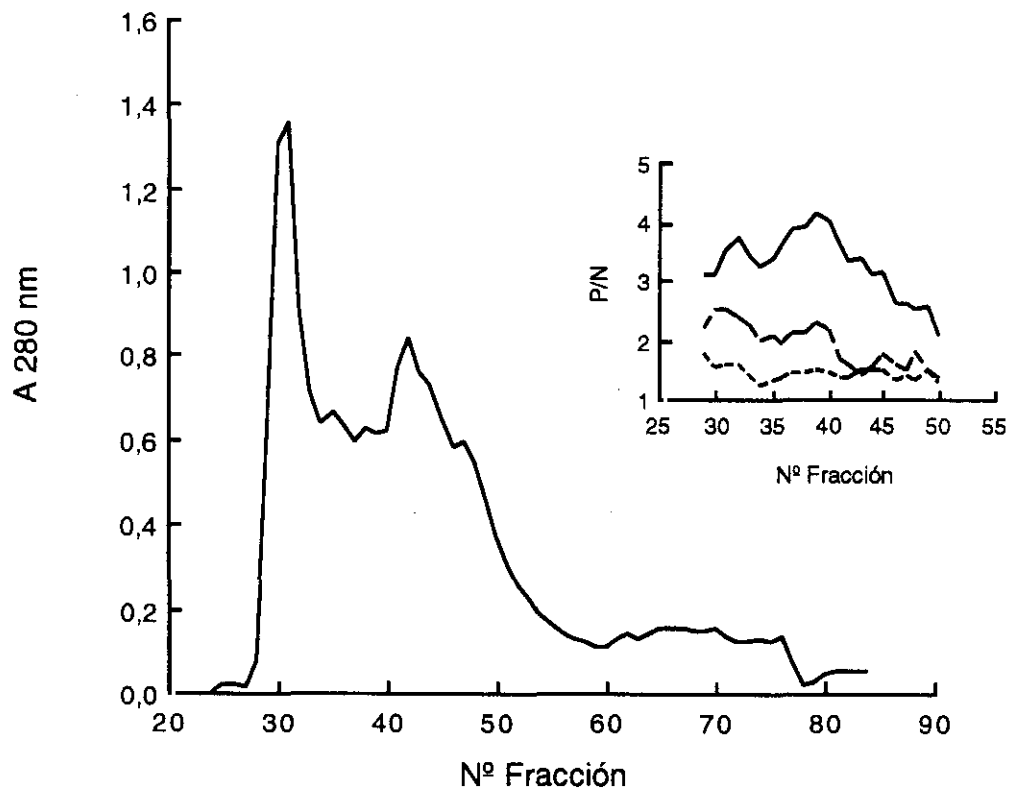


Figura 22. Cromatograma representativo del extracto soluble de adultos aplicado a gel filtración (sephacryl S-200). Las barras muestran las mezclas de fracciones. Inserto: Índice Positivo/Negativo mediante ELISA realizado con las fracciones individuales.

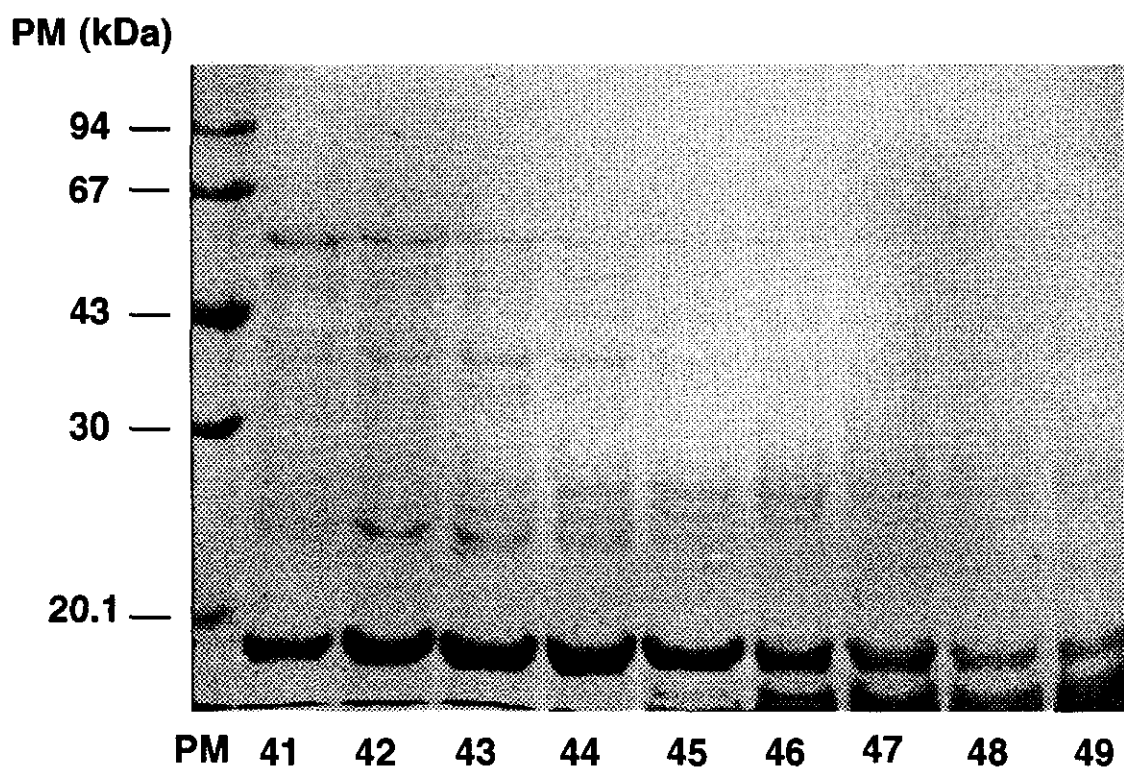
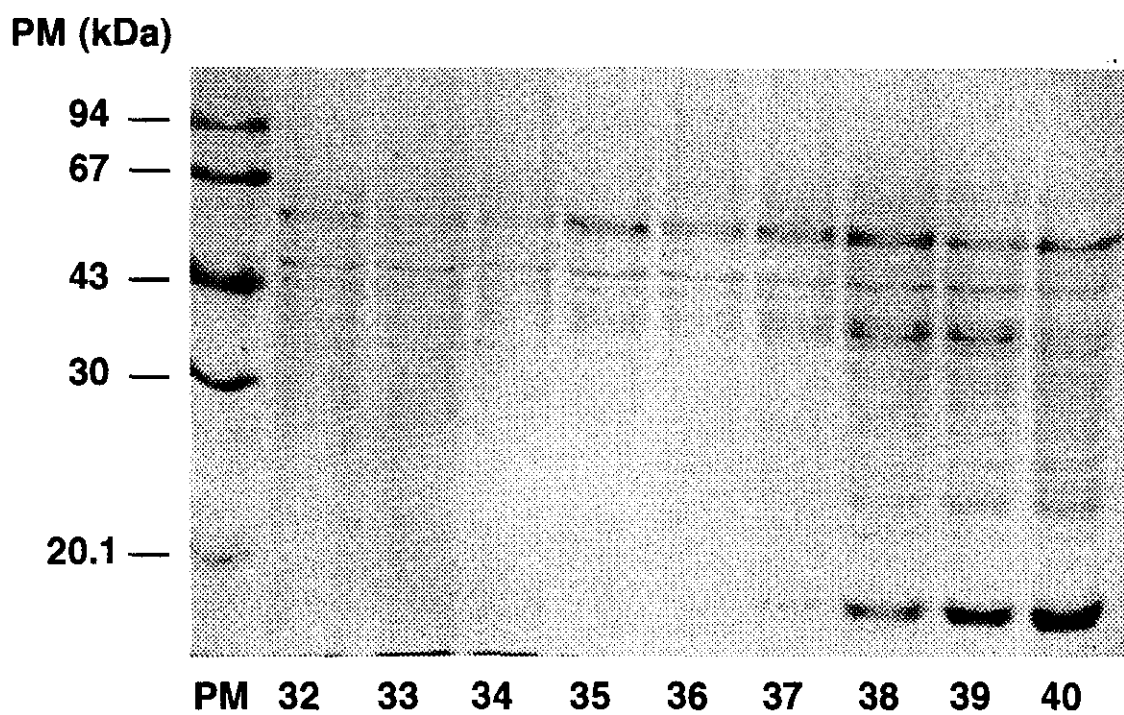


Figura 23. SDS-PAGE (12,5% acrilamida) de las fracciones individuales (32-49) obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular del extracto soluble de adultos. En la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

En la Figura 24 se muestran las inmunodetecciones realizadas con 12 fracciones individuales (nº36 a 47) procedentes de gel filtración correspondientes a las zonas A3 y A4, con los mayores valores del índice P/N en el ELISA, enfrentadas a mezclas séricas de animales sin infestar, o bien infestados monoespecíficamente de forma homóloga (**H.contortus**, n=5) o heteróloga (**T.colubriformis**, n=2 y **Te.circumcincta**, n=2).

Los resultados obtenidos en los WB estuvieron correlacionados con los valores del ELISA. En general, con todas las fracciones existió un mayor reconocimiento antigénico por parte de los sueros homólogos, en especial con las fracciones correspondientes a la mezcla A4. Los sueros del ganado ovino infestado con **Te.circumcincta** y, particularmente, con **T.colubriformis** reaccionaron con las fracciones ensayadas. No obstante, se identificó una región de bajo PM (20-30 kDa), presente en mayor o menor medida en todas las fracciones de A4, intensamente reconocida por las mezclas séricas homólogas (anti-**Haemonchus**).

Teniendo en cuenta el escaso rendimiento tras la cromatografía de gel filtración de las fracciones individuales, la mezcla A4 se enfrentó, tras la electroforesis, a sueros de animales sin infestación y con infestaciones homólogas y heterólogas (Fig. 25). El WB mostró que aparentemente, la mezcla A4 de ESA de **H.contortus** está antigénicamente más relacionada con **T.colubriformis** que con **Te.circumcincta** y que dicha fracción contenía una región peptídica de PM aparente ca.26 kDa aparentemente específica ya que sólo fue reconocida por los sueros provenientes de corderos infestados con **H.contortus**.

El estudio de la composición glicoproteica de ESA (Fig. 21) sólo mostró reactividad notable en regiones de PM elevado (>67 kDa) aunque se hallaron algunas bandas escasamente marcadas en regiones de PM inferior. Sin embargo, el estudio de las mezclas obtenidas de la cromatografía de gel filtración (Fig. 26) mostró que A1 reaccionó en PM >67 kDa, mientras que A3 contenía una banda claramente teñida de ca. 55 kDa. La mezcla A2 y, en particular, A4, que contenía el péptido de ca. 26 kDa no reveló la presencia de glicoproteínas.

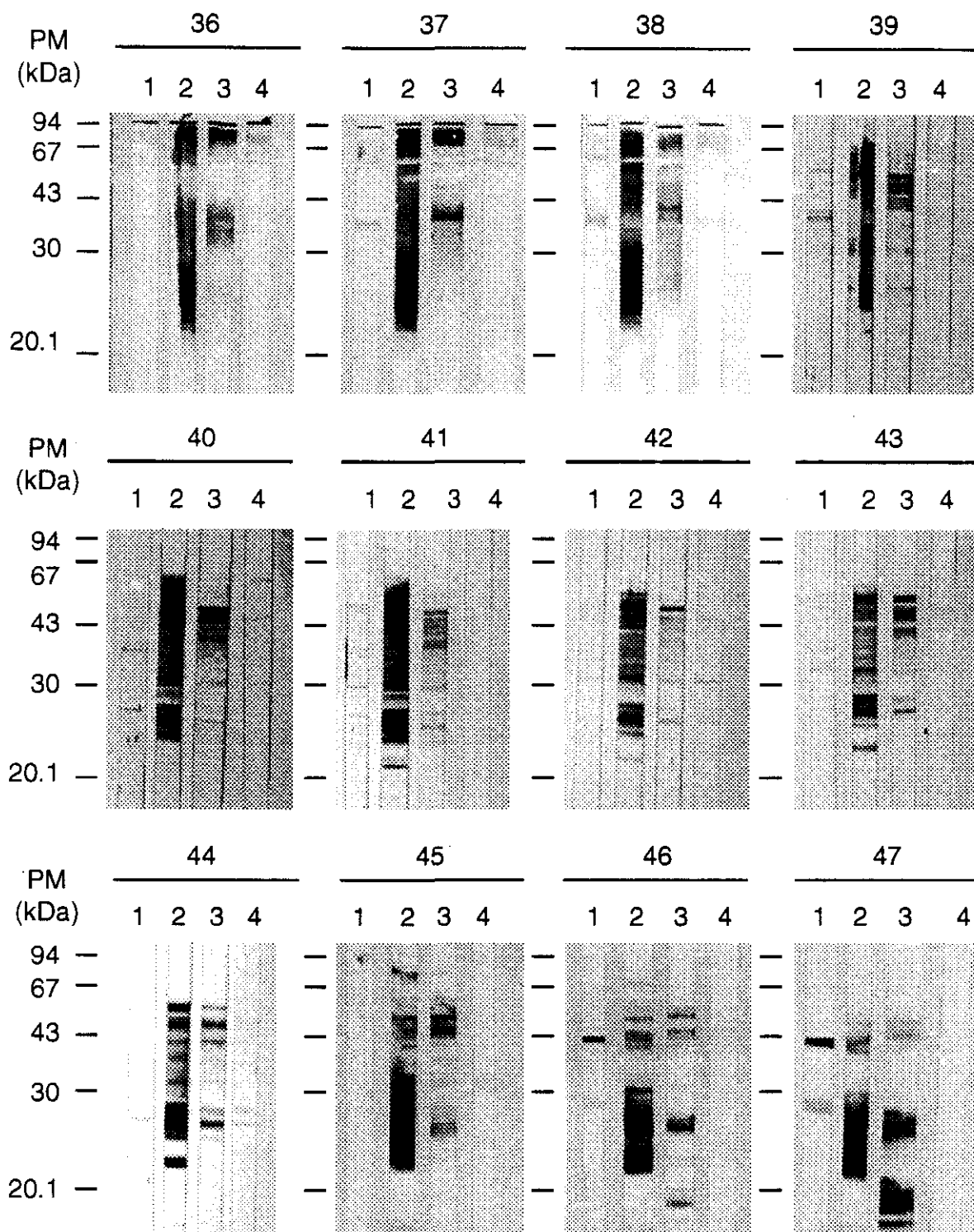


Figura 24. Inmunodetecciones realizadas con las fracciones 36 a 47 procedentes de gel filtración del ESA. Las tiras se enfrentaron a mezclas séricas de animales libres de infestación (1), o bien infestados con **H. contortus** (2), **T. colubriformis** (3) o **Te. circumcincta** (4). En la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

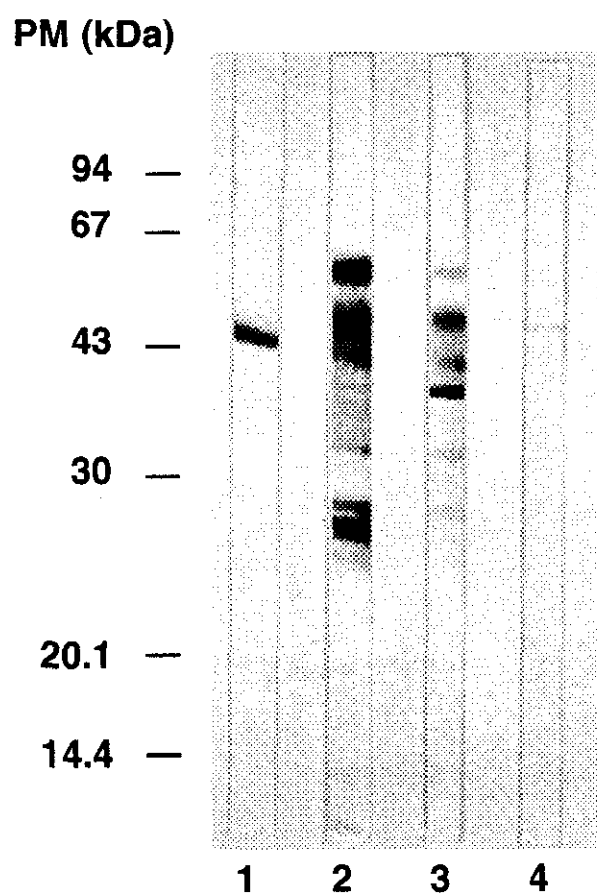


Figura 25. Inmunodetección realizada con A4. Las tiras se enfrentaron a mezclas séricas de animales sin infestar (1), o bien infestados con **H. contortus** (2), **T. colubriformis** (3) o **Te. circumcincta** (4). En la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

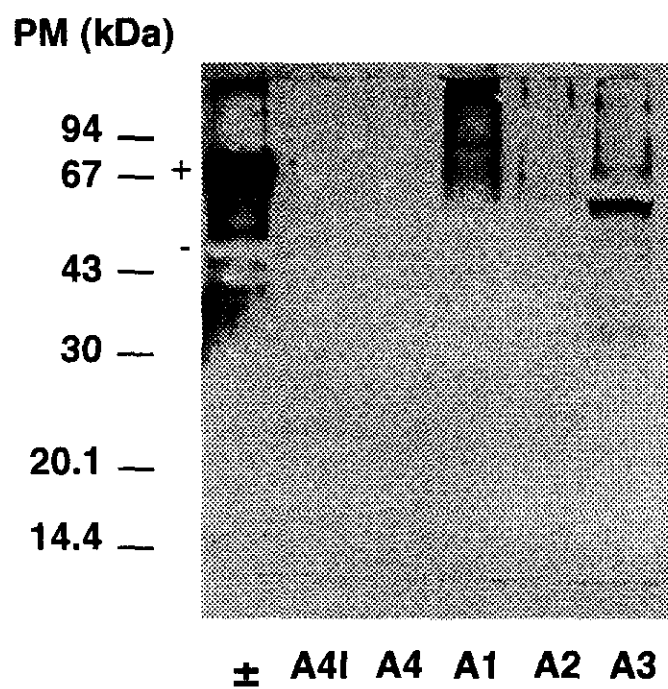


Figura 26. Detección de glicoproteínas realizada con las mezclas de fracciones procedentes de gel filtración A1, A2, A3 y A4, así como del extracto enriquecido A4I. Se incluyeron controles positivo y negativo (\pm). A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

3.2.2.b. Intercambio iónico

La Figura 27 muestra un cromatograma típico obtenido a partir de ESA aplicado a una columna cargada con intercambiador aniónico (DEAE-Sephacel) y eluido con un gradiente 0-0,4 M NaCl. Se obtuvieron 4 picos principales (A280) en la elución: "a1" o fracción no unida, "a2" o primer pico de elución del gradiente salino seguida de "a3" y "a4", eluidas todas ellas entre 0,1 y 0,2 M de NaCl.

Se llevó a cabo un ensayo de inmunoensayo con las fracciones seleccionadas del cromatograma, tras ser dializadas frente a PBS, según se ha descrito en el Capítulo de Material y Métodos. Las fracciones a3 y a4 incrementaron ligeramente la sensibilidad del ELISA (P/N) (+0,2 y +0,4 respectivamente) cuando se comparó con la obtenida con el ESA sin fraccionar. La mayor especificidad (Positivo/Heterólogo), sin embargo, se halló en a2. En la Tabla XI se muestran los índices P/N logrados en el ELISA cuando se enfrentaron las fracciones a sueros de animales sin infestar e infestados de forma homóloga y heteróloga.

Las fracciones individuales correspondientes a las zonas de elución se dializaron frente a PBS y se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante y reductora (SDS-PAGE) (Figura 28). En la electroforesis se pudo comprobar la separación proteica lograda con esta cromatografía, apareciendo en todas las zonas de elución analizadas péptidos de muy variado PM. Las fracciones a3 y, particularmente a4, fueron en nuestras condiciones las que presentaron una menor cantidad de proteínas. Por su parte, tanto en a1 como en a2 se localizaron bandas proteicas de PM estimado entre 25 y 30 kDa, de motilidad electroforética similar a la obtenida en los WB tras el fraccionamiento mediante gel filtración de ESA. Las zonas de elución escogidas, se analizaron mediante inmunodetección, que aparece en la Figura 29. Las fracciones a3 y a4 mostraron un patrón de reconocimiento muy similar, por lo que únicamente se muestra la inmunodetección realizada con la fracción a3; en ésta podemos observar una clara reactividad en

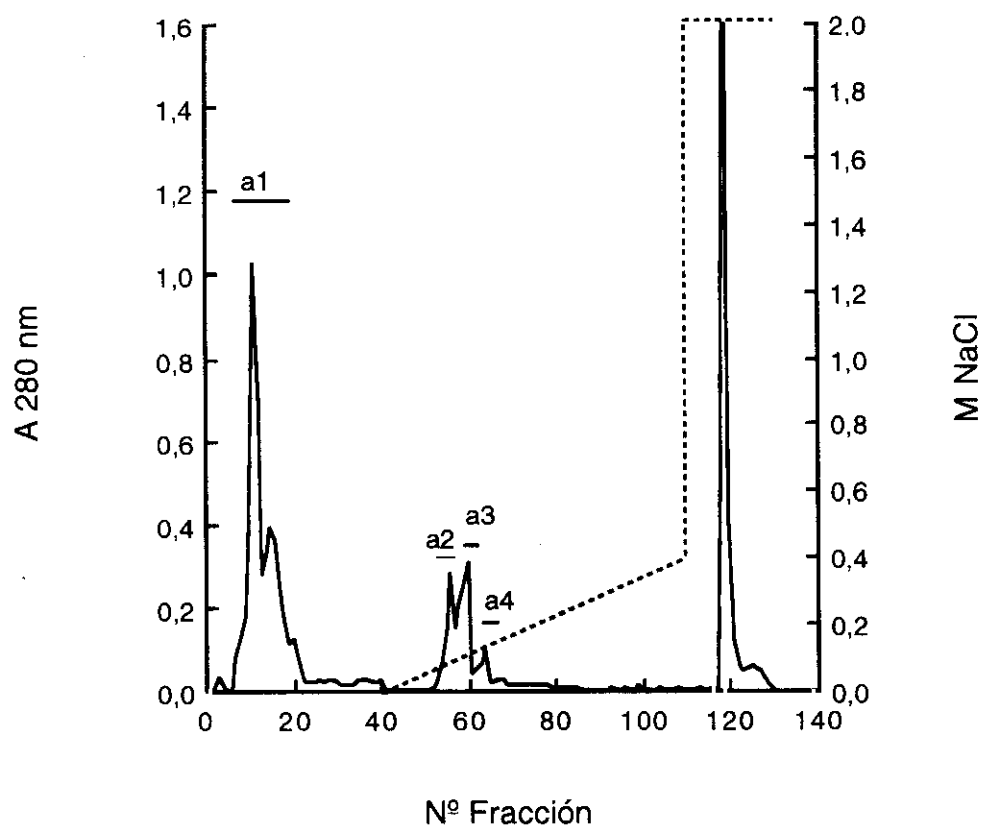


Figura 27. Cromatograma representativo de la elución del ESA con un gradiente salino (0-0,4M NaCl) del gel de intercambio iónico (DEAE-sephacel).

	ESA	a1	a2	a3	a4
P/N	3,1	3,1	3,0	3,3	3,4
(H. contortus)					
P/N	2,0	1,9	1,62	2,2	2,9
(T. colubriformis)					
P/N	1,2	1,0	1,1	1,1	1,2
(Te. circumcincta)					

Tabla XI. Índices Positivo/Negativo del ELISA realizado con las fracciones obtenidas mediante cromatografía de intercambio iónico a partir de ESA.

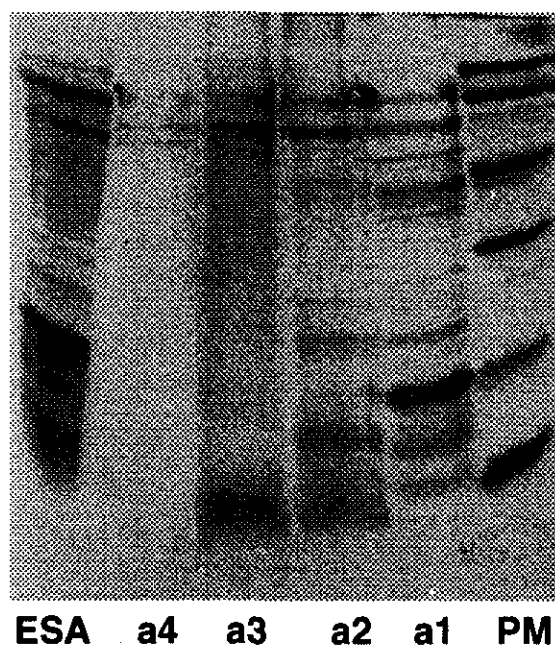


Figura 28. SDS-PAGE (12,5% acrilamida) de las fracciones seleccionadas (a1, a2, a3 y a4) de la cromatografía de intercambio iónico del extracto soluble de adultos (ESA). Los marcadores de peso molecular (PM) aparecen en el carril derecho.

PM (kDa)

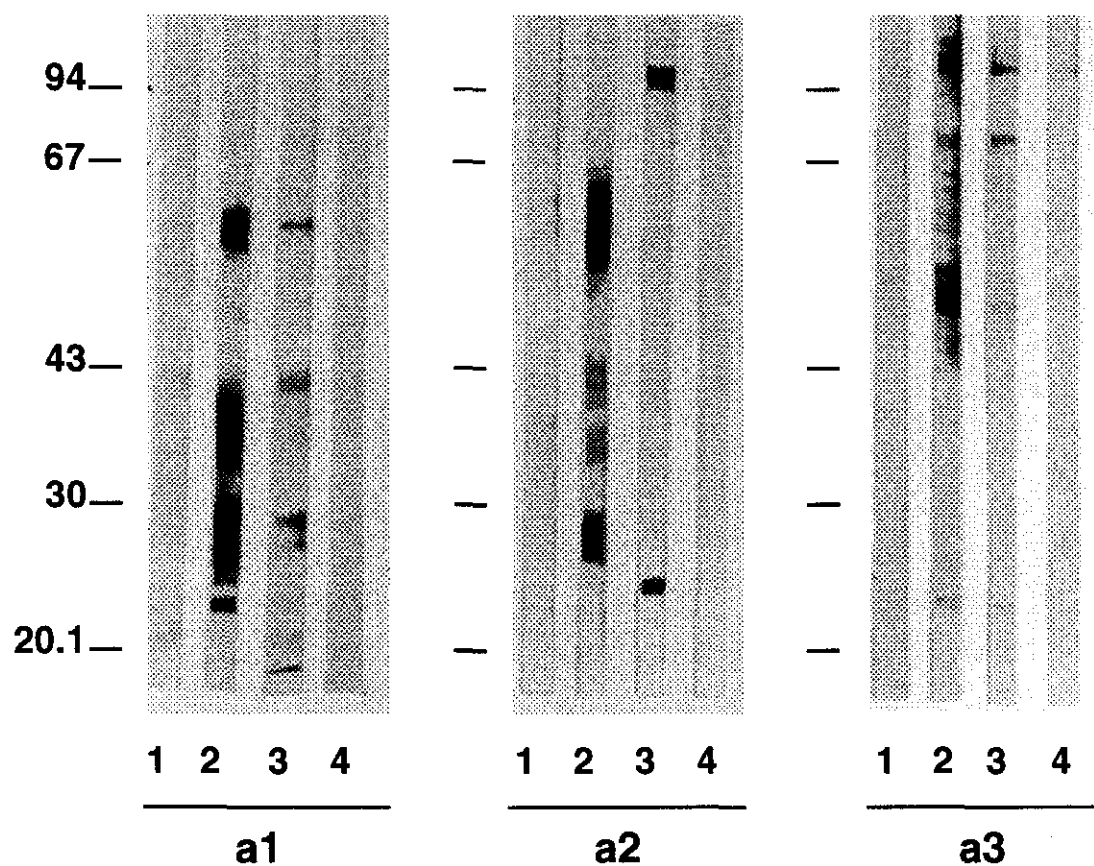


Figura 29. Inmunodetección realizada con las fracciones seleccionadas (a1, a2 y a3) de la cromatografía de intercambio iónico del ESA enfrentadas a mezclas séricas de animales sin infestar (1), o bien infestados con **H. contortus** (2), **T. colubriformis** (3) o **Te. circumcincta** (4). En la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

una región de **ca. 55 kDa** de escaso valor diagnóstico aparente. En la fracción a1 se halló inmunorreactividad en la región situada entre 25 y 28 kDa tanto con los sueros de animales infestados con **H. contortus** como con los de animales infestados con **T. colubriformis**. En la fracción a2 los sueros homólogos presentaron un reconocimiento de la región de 25-27 kDa, así como de 55 kDa, no siendo reconocidos estos péptidos por los animales sin infestar o infestados de forma heteróloga. Los sueros anti-**T. colubriformis** reaccionaron con péptidos de 22-23 y **ca. 67 kDa**, reactividad no observada al emplear sueros homólogos.

Teniendo en cuenta el interés en la determinación de la presencia de residuos azucarados en los péptidos estudiados, se procedió al igual que en el caso anterior, al estudio de la presencia de glicoproteínas en las fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico de ESA. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 30.

En la fracción a1 no aparecieron cantidades notables de glicoproteínas, mientras que en a2, a3 y a4 apareció un patrón muy similar al detectado con el ESA sin fraccionar; es decir, se detectaron glicoproteínas de PM >67 kDa en el caso de a1, con dos bandas fuertemente marcadas correspondientes a PM **ca. 70 kDa** y >94 kDa, y una tinción superior a 43 kDa en el caso de a2 y a3. En la misma figura se muestra la inmunodetección realizada con la transferencia utilizada para la tinción de glicoproteínas. Podemos comprobar que en la fracción a2 aparece reconocido el péptido de **ca. 26 kDa** por el suero de animales infestados monoespecíficamente con **H. contortus** y que en la detección de glicoproteínas no se tiñó, por lo que aparentemente dicho péptido no corresponde a una glicoproteína. En las fracciones eluidas con el gradiente salino apareció un reconocimiento por parte de los sueros de animales infestados con **H. contortus** (fracciones a2, a3 y a4) y de los infestados con **T. colubriformis** (fracciones a3 y a4) de una región de aproximadamente 55 kDa PM aparentemente correspondientes a glicoproteínas.

3.2.2.c. Caracterización mediante gel filtración + intercambio iónico

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante las separaciones cromatográficas de ESA, se procedió al fraccionamiento secuencial de este extracto antigénico. Para ello se partió de la fracción A4 de ESA, obtenida tras la

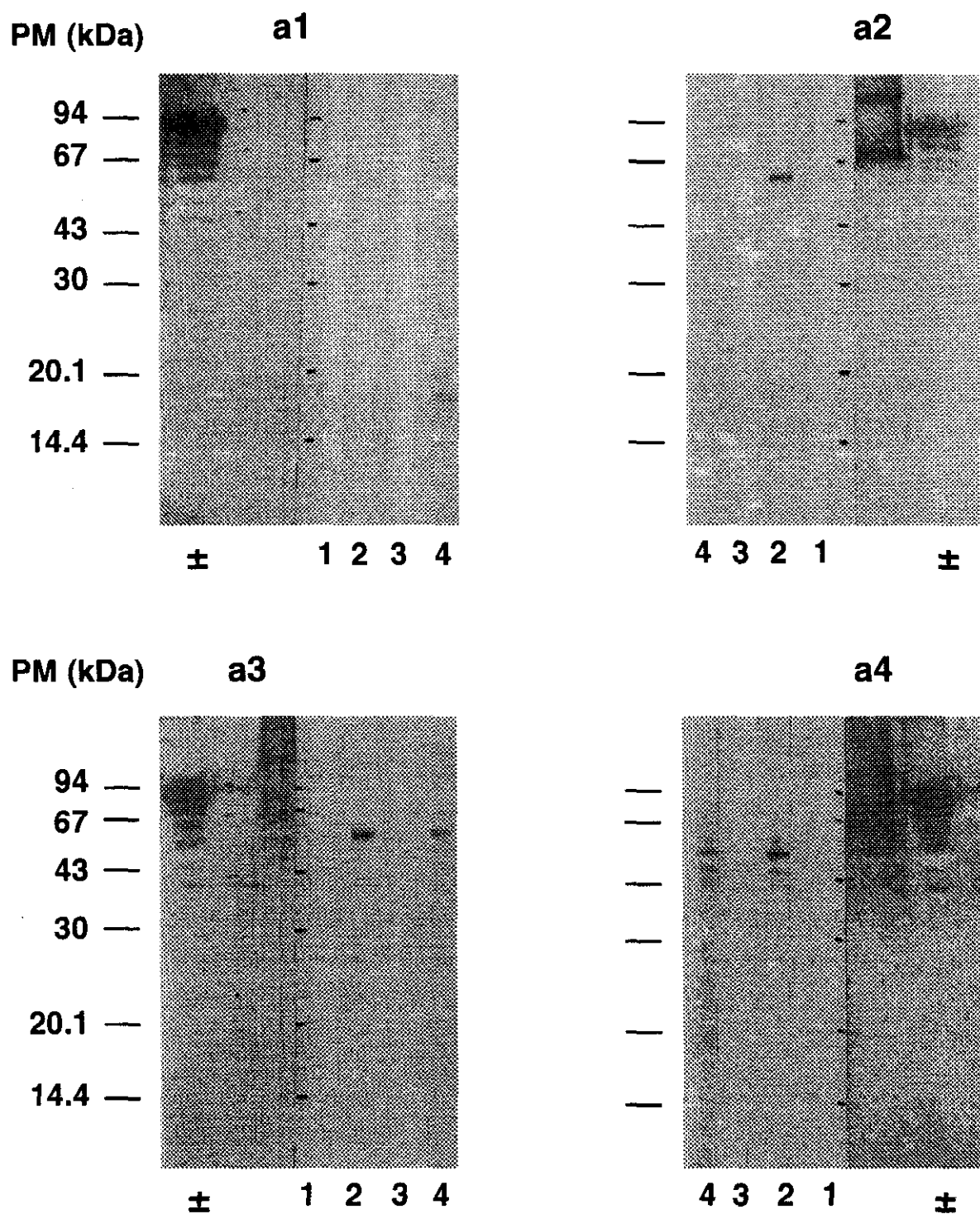


Figura 30. Detección de glicoproteínas realizada con las fracciones seleccionadas (a1, a2, a3 y a4) de la cromatografía de intercambio iónico de ESA. Se introdujeron controles con (+) y sin (-) glicoproteínas(±). Las tiras se enfrentaron a mezclas séricas de animales sin infestar (1), o bien infestados con **H. contortus** (2), **T. colubriformis** (3) o **Te. circumcincta** (4). A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

cromatografía de exclusión molecular, que se aplicó al gel de intercambio iónico (DEAE-Sephacel). Previamente, A4 fue dializada frente al tampón de elución (Tris-HCl 50 mM pH=7,4). La cromatografía se desarrolló con un gradiente salino entre 0 y 0,4 M de NaCl en el mismo tampón y el cromatograma obtenido se muestra en la Fig. 31, donde se apreció la aparición de un pico único de A280 que eluyó alrededor de 0,1 M de NaCl.

El pico de la cromatografía correspondía aproximadamente a 8 tubos, que fueron dializados frente a PBS, concentrados con acetona fría y sometidos a análisis electroforético (SDS-PAGE), que se muestra en la Figura 32. El pico obtenido sólo contenía entre 6-8 péptidos, apareciendo una banda de PM ca. 26 kDa. Aquellas fracciones con A280 más elevada, y en las que se encontraba presente el péptido de ca. 26 kDa, se unieron y se denominaron A4I.

Con esta fracción se realizó una inmunodetección puntual empleando mezclas séricas de animales no infestados o infestados con **H. contortus** (n=5), así como de sueros individuales de animales infestados con **T. colubriformis** (n=2) o **Te. circumcincta** (n=2). Sólo resultó reconocido el péptido de ca. 26 kDa de la fracción A4I con los sueros homólogos, mientras que los sueros de animales libres de infestación o bien infestados con las otras dos especies parásitas no mostraron ningún reconocimiento notable (Figura 33), lo que suponía la purificación parcial de un antígeno soluble de **H. contortus** aparentemente específico presente en la fracción obtenida tras la gel filtración + intercambio iónico de ESA. Además, no se observó la presencia de glicoproteínas en esta fracción (Fig. 26).

Teniendo en cuenta la extensión de las reacciones cruzadas, en los ELISA, entre los extractos solubles (ESL y ESA) de **H. contortus** y los sueros de animales con infestaciones heterólogas (**Te. circumcincta**, **T. colubriformis**), aunque en las inmunodetecciones llevadas a cabo con A4I sólo se observó el reconocimiento del antígeno de ca. 26 kDa de ESA con los sueros homólogos, se consideró de interés explorar la posibilidad de que dicho péptido estuviese presente en otros trichostrongyloideos, como paso previo a su valoración diagnóstica. Con dicho objetivo se llevó a cabo el siguiente apartado.

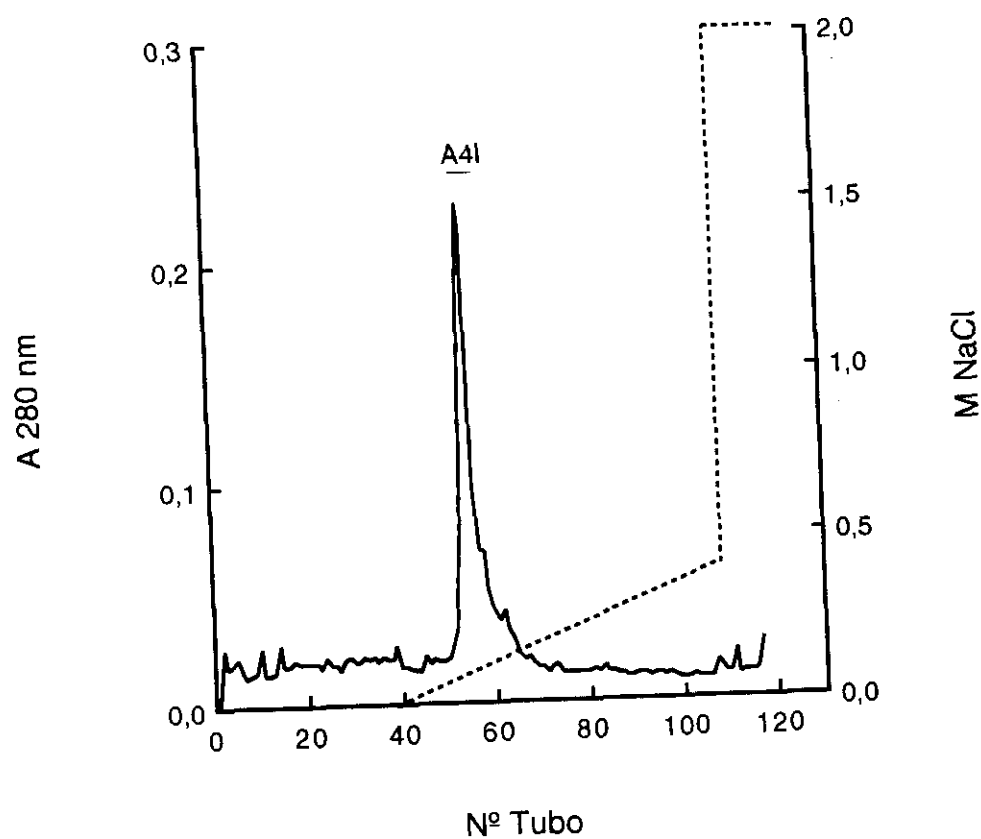


Figura 31. Perfil de elución obtenido al separar A4 mediante cromatografía de intercambio iónico (DEAE-sephacel) y eluída con un gradiente salino (0-0,4M NaCl).

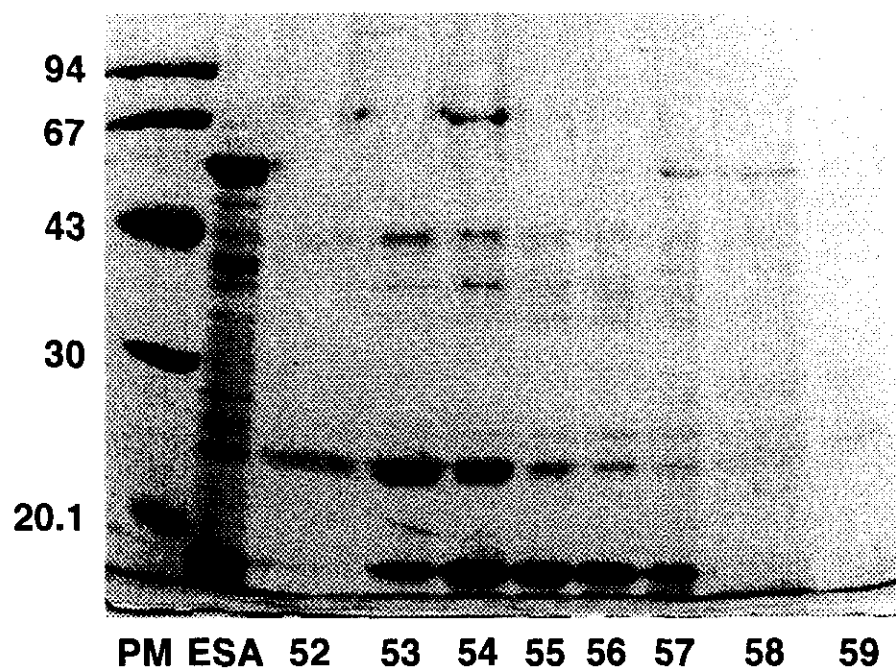


Figura 32. SDS-PAGE (12,5% acrilamida) de las fracciones obtenidas (52-59) en el gradiente salino de la cromatografía de intercambio iónico de A4. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

PM (kDa)

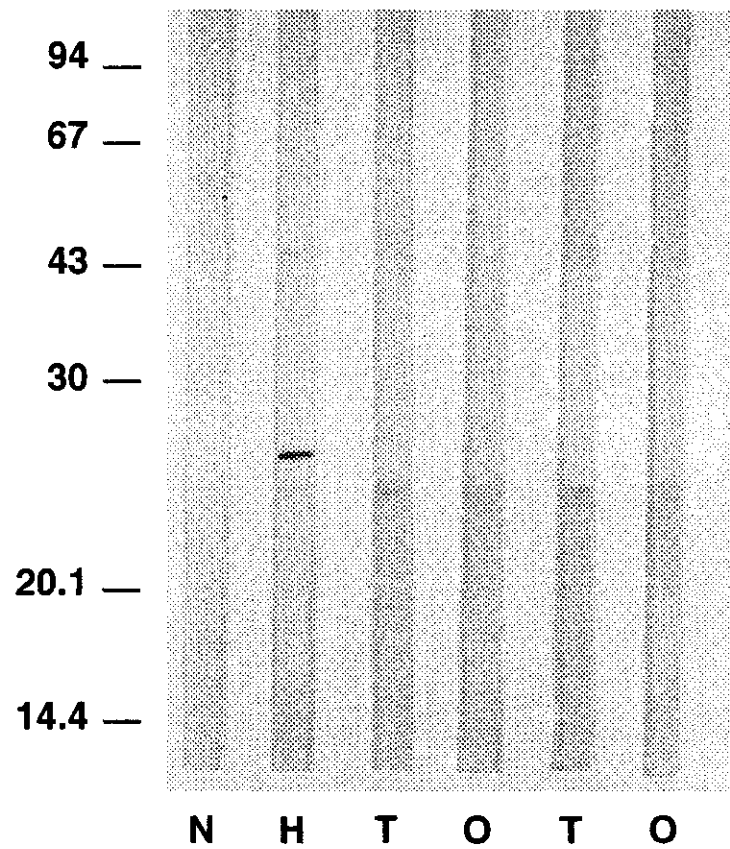


Figura 33. Inmunodetección realizada con A4I enfrentada a sueros de animales sin infestar (N), o bien infestados con **H. contortus** (H), **T. colubriformis** (T) o **Te. circumcincta** (O). En la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

3.2.2.d. Reconocimiento de **H. contortus** por sueros hiperinmunes

Para ello se obtuvieron sueros hiperinmunes en conejo frente a los extractos solubles, adultos y larvarios, de **H. contortus**, **T. colubriformis** y **Te. circumcincta**, según se ha descrito en el Capítulo de Material y Métodos.

Al ensayar mediante enzimoimmunoensayo la reactividad existente frente a ESA, ESL de **H. contortus** y A4I de los 6 sueros hiperinmunes obtenidos, en todos los casos fue superior con los sueros anti-extracto soluble de adultos de las tres especies estudiadas (Tabla XII). Únicamente se detectó reactividad frente a A4I en los sueros anti-ESA, resultando nula o muy escasa en los sueros anti-ESL. La mayor homología frente a A4I se comprobó entre el suero anti-ESA de **Te. circumcincta** y el suero anti-ESA de **H. contortus**, resultando un título superior en el ensayo en el último caso, mientras que el suero anti-ESA de **T. colubriformis** desarrolló la mitad de título que los otros dos sueros.

Las inmunodetecciones realizadas con los mismos extractos y enfrentados a los mismos sueros (Figura 34) confirmaron la amplia reactividad cruzada que existió entre los extractos solubles de adultos (ESA) o larvarios (ESL) de las 3 especies parásitas estudiadas. Las inmunodetecciones realizadas frente a A4I, por su parte permitieron observar un importante reconocimiento por parte de los sueros anti-ESA de **H. contortus** y **Te. circumcincta**; sin embargo únicamente el suero producido frente al extracto adulto (ESA) de **H. contortus** reconoció de forma ligera el péptido de 26 kDa, apoyando la especificidad de este péptido.

3.2.3. Valoración diagnóstica de A4I mediante inmunodetección

3.2.3.a. Infestaciones experimentales monoespecíficas homólogas y heterólogas

Con el fin de comprobar la validez diagnóstica del péptido parcialmente aislado por nosotros se realizaron inmunodetecciones enfrentando A4I con mezclas séricas seriadas de corderos menores de 5 meses de edad que habían sufrido infestaciones monoespecíficas con **H. contortus** (n=7), **T. colubriformis** (n=4) o **Te. circumcincta** (n=6) y que habían sido utilizados como donadores de

	ESL <i>H.contortus</i>	ESA <i>H.contortus</i>	A4I
anti-ESA <i>H.contortus</i>	0,723	0,953	0,852
anti-ESL <i>H.contortus</i>	0,674	0,453	0,036
anti-ESA <i>T.colubriformis</i>	0,907	0,838	0,312
anti-ESL <i>T.colubriformis</i>	0,872	0,692	0,086
anti-ESA <i>Te.circumcincta</i>	0,778	0,808	0,75
anti-ESL <i>Te.circumcincta</i>	0,667	0,58	0,05

Tabla XII. Títulos de anticuerpos séricos obtenidos mediante ELISA (A405 nm) cuando se enfrentaron distintos extractos proteicos a los sueros hiperinmunes anti-extracto soluble de adultos (ESA) y larvario (ESL) de ***H. contortus***, ***T. colubriformis*** y ***Te. circumcincta***.

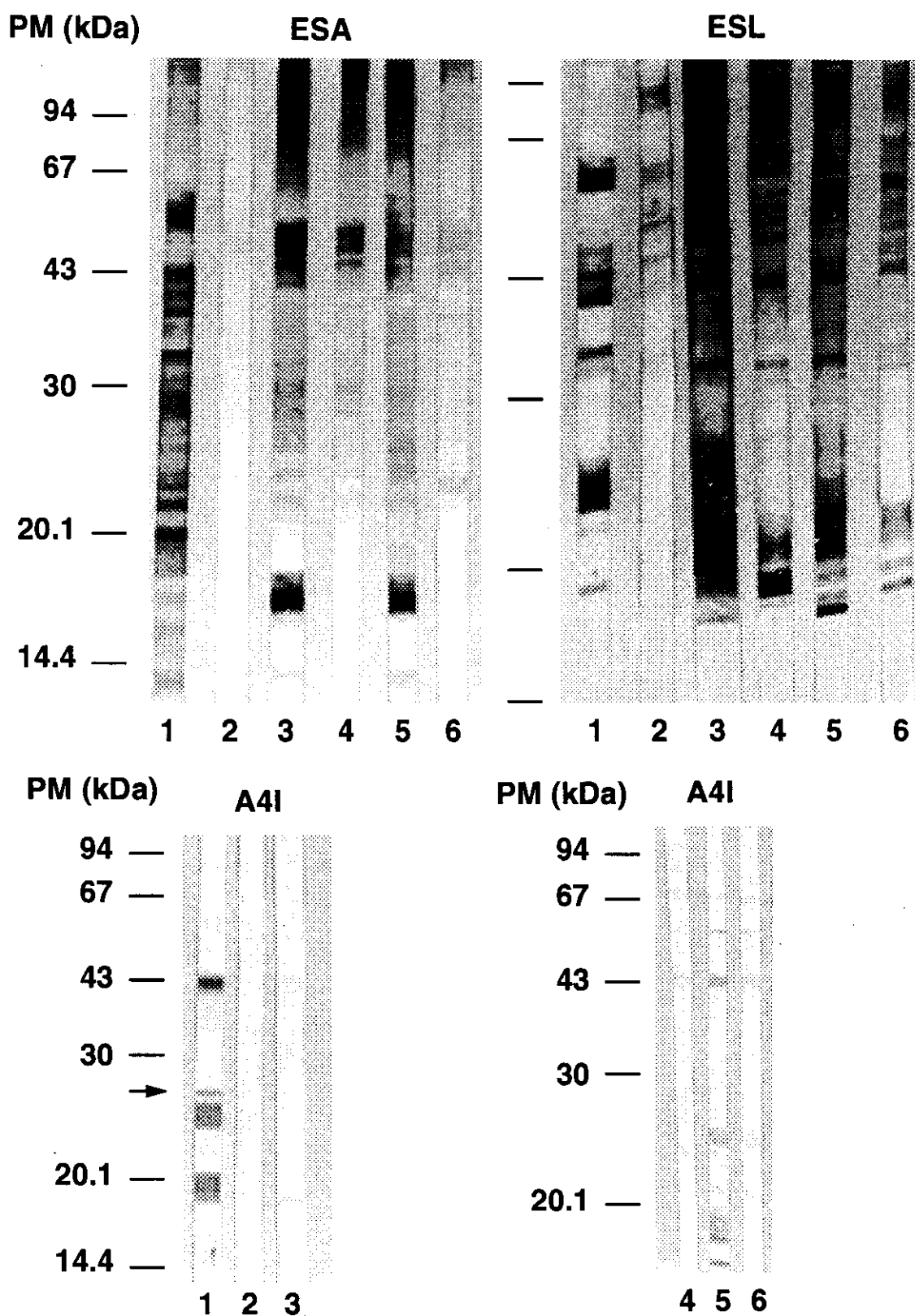


Figura 34. Inmunodetecciones realizadas con ESA, ESL y A4I de *H. contortus* enfrentadas a los sueros hiperinmunes obtenidos frente a ESA de *H. contortus* (1), *T. colubriformis* (3) y *Te. circumcincta* (5), así como frente a ESL de *H. contortus* (2), *T. colubriformis* (4) y *Te. circumcincta* (6). A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

material parasitario. En la Figura 35 se muestra la inmunodetección realizada con las mezclas séricas de los animales infestados de forma homóloga o heteróloga en los días previos a la infestación así como los días 14 (prepatencia), 28 (patencia temprana) y 45 postinfestación (patencia avanzada). En la inmunodetección se comprobó el reconocimiento del antígeno de 26 kDa a partir del día 14 postinfestación, a pesar de que en el día 28 postinfestación no se evidenció un reconocimiento tan claro del mismo. En el día 45 de nuevo los sueros de los corderos con hemoncosis reconocieron el péptido. En el resto de corderos con infestaciones heterólogas no apareció en ninguno de los días estudiados reconocimiento del antígeno de 26 kDa. Por último, se pudo observar que todos los animales, tanto antes de ser infestados como durante el transcurso de las infestaciones provocadas, reconocieron de forma muy evidente una banda situada en ca. 39 kDa presente en A4I, no relacionada con la infestación por *H. contortus*.

3.2.3.b. Validez diagnóstica interracial

Uno de los factores limitantes del diagnóstico de la hemoncosis ha sido la variable respuesta, no sólo individual, sino, y de forma más consistente, la presente en dependencia de las razas ovinas consideradas. En nuestro caso se consideró de especial interés su valoración en razas ovinas autóctonas, en particular las ensayadas anteriormente. Además se estimó que era necesario el estudio seriado de dichas infestaciones.

Se realizaron inmunodetecciones con los sueros de los animales empleados en las infestaciones experimentales que involucraron a 4 razas ovinas autóctonas españolas. Las Figuras 36a-36d muestran las inmunodetecciones seriadas realizadas con los diferentes grupos experimentales de las distintas razas empleadas. En todas ellas se detectó el antígeno de 26 kDa durante las primoinfestaciones en el periodo de prepatencia (día 14 tras la infestación con la dosis de prueba) así como durante la patencia (días 28 y 42 después de la infestación con la dosis de prueba). Los animales que recibieron las dos infestaciones reconocieron de forma evidente el antígeno de 26 kDa parcialmente purificado durante los días estudiados, con la excepción de los animales de raza Churra y Merina que perdieron este reconocimiento en el día 28 postinfestación. Asimismo se comprueba un reconocimiento más intenso del péptido en los

PM (kDa)

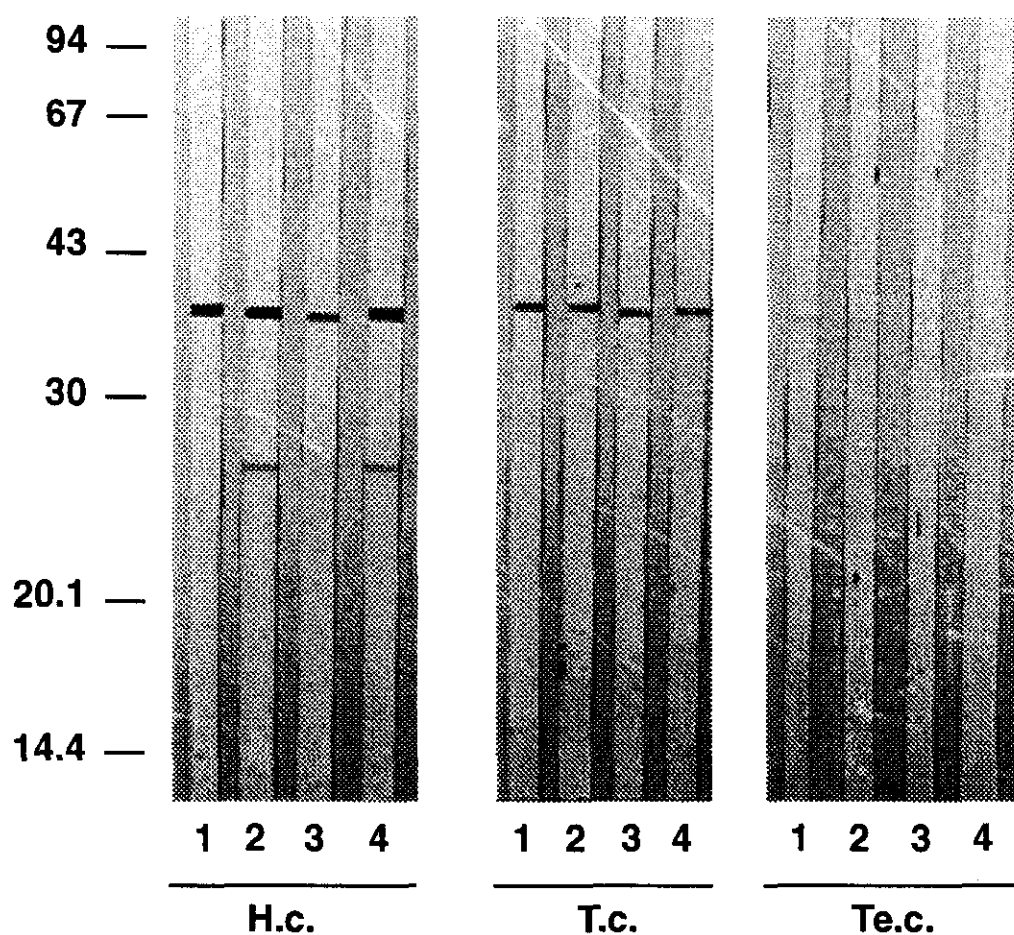


Figura 35. Inmunodetecciones realizadas con los sueros de corderos infestados de forma específica con **H. contortus** (n=7, **H.c.**), **T. colubriformis** (n=4, **T.c.**) y **Te. circumcincta** (n=6, **Te.c.**) enfrentados con A4I en la preinfestación (1) así como en los días 14 (2), 28 (3), y 45 (4) postinfestación. En la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

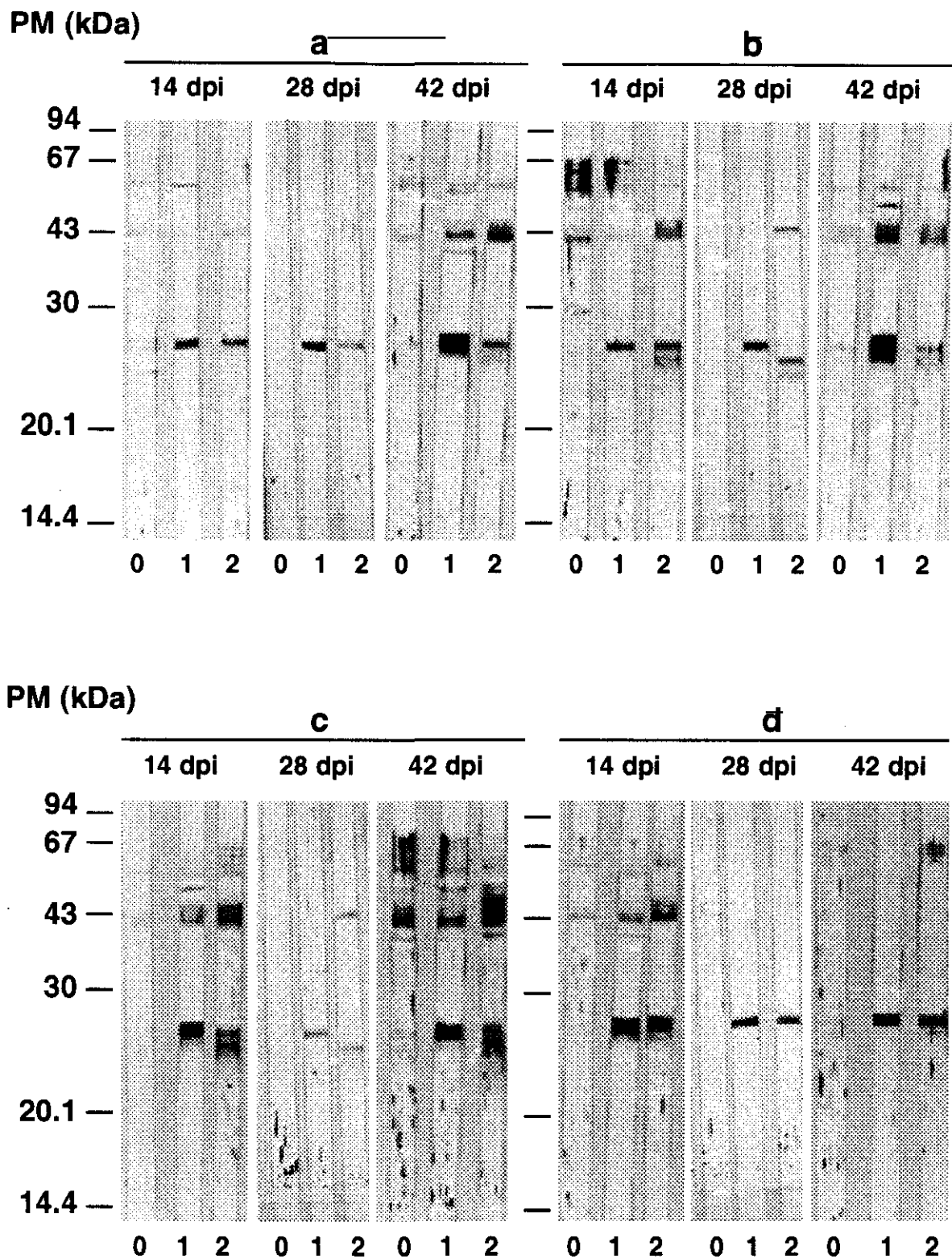


Figura 36. Inmunodetección realizada con los tres grupos experimentales ("0", "1" y "2") de los animales de raza Castellana (a), Churra (b), Merina (c) y Manchega (d) durante los días 14, 28 y 42 postinfestación (dpi) con la dosis de prueba. En la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

animales pertenecientes al grupo 1, es decir, de aquellos animales que únicamente recibieron la infestación con la dosis de prueba y que mayor carga parasitaria portaban, según se demostró en la eliminación fecal de huevos o en las poblaciones totales parasitarias recogidas **postmortem** en el abomaso.

Una vez comprobada la validez diagnóstica interracial en las razas ovinas autóctonas ensayadas, la disponibilidad de sueros de ganado ovino de raza Texel cedidos por el Dr. H.Schallig (Departamento de Inmunología, Universidad de Utrecht, Holanda), infestados de forma experimental con **H. contortus** o bien libres de infestación, nos permitió ensayar la fracción A4I. Los sueros, enfrentados en inmunodetecciones con esta fracción (Fig. 37) mostraron que ninguno de los animales libres de infestación reconoció el antígeno de 26 kDa, mientras que los animales que sufrieron infestaciones con el nematodo reconocieron en su mayoría el péptido.

3.2.3.c. Infestaciones naturales mixtas

Se tomaron muestras fecales y séricas de animales que pastaban en el campo y que sufrían infestaciones naturales con tricostrongídeos así como con otros parásitos. En la Tabla XIII se muestran los datos parasitológicos correspondientes a los animales y explotaciones muestreadas. Aparecieron cargas moderadas de huevos de tricostrongídeos en los análisis fecales de la mayoría de las explotaciones, así como huevos de otros géneros parasitarios tales como **Dicrocoelium**, **Moniezia** o **Nematodirus**. **H. contortus** sólo fue detectado en los coprocultivos de las explotaciones correspondientes a "El Molar" y "El Espartal", mientras que en el resto de explotaciones se identificaron larvas correspondientes en su mayor parte a los géneros **Teladorsagia** y **Trichostrongylus**, apareciendo en menor proporción **Chabertia**, **Oesophagostomum** y **Cooperia**.

En la Figura 38 se muestran las inmunodetecciones realizadas con A4I enfrentada con los sueros individuales de los animales muestreados, así como con las mezclas séricas correspondientes a las distintas explotaciones. En la figura correspondiente a los sueros individuales comprobamos que 5 de los 8 animales (62,5%) pertenecientes a la explotación "El Espartal" reconocieron de forma evidente el antígeno de 26 kDa. De los 20 animales pertenecientes a "El Molar", 11

PM (kDa)

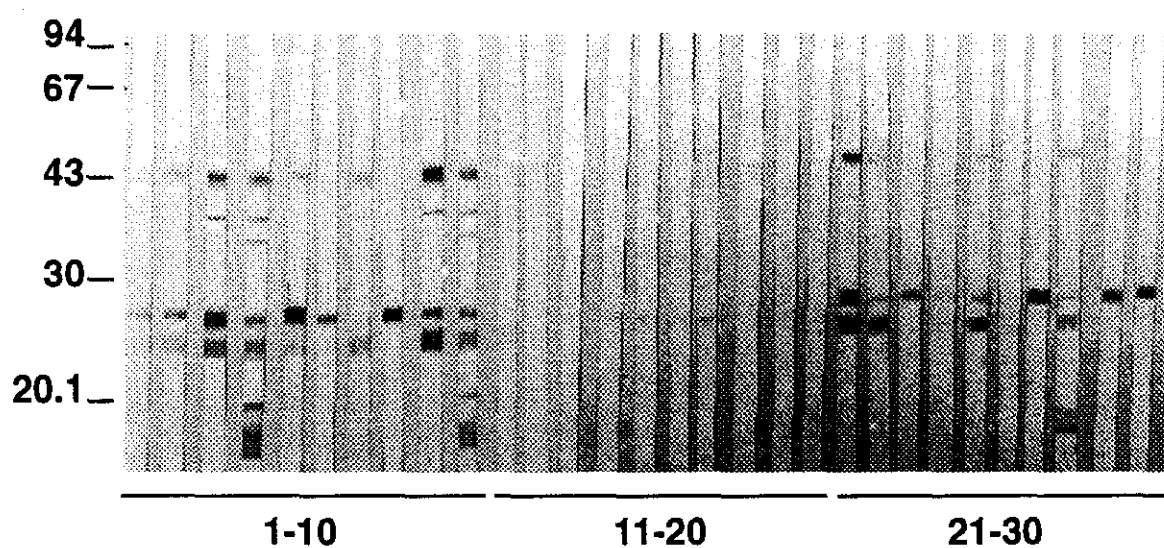


Figura 37. Inmunodetección realizada con A4I enfrentada a sueros individuales de animales de raza Texel cedidos por el Dr. Schallig e infestados experimentalmente con **H. contortus** (1-10 y 21-30) o libres de infestación (11-20). En la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

Explotación	nº de animales	hpg estrongílicos	hpg otros	géneros presentes
S. Sebastián Reyes	10	30-1065 (324±313)	N (12±16,2) Tch (4,5±6,9) M (120±240,4)	Te (48,6%) T (51,4%)
Torrelaguna	8	0-45 (13±16)	N (2±5) Tch (7,5±15)	Te (93,6%) T (6,4%)
El Espartal	8	60-1215 (529±353)	D (1,9±5) N (3,8±10) Tch (3,8±6,5)	Te (55,3%) T (43,6%) H (0,3%) Ch (0,1%) Oe (0,7%)
El Espartal (bis)	4	0-195 (71±77)	N (3,8±6,5)	Te (49,7%) T (50,3%)
Murcia	4	0	N (22,5±16,8) Cp (19±32,5) D (56,3±80,3)	
León	2	1290-2070 (1680)	Cp (7,5) N (7,5)	Te (30,25%) T (69,25%) Ch (0,5%)
Talamanca del Jarama	9	60-360 (157±88)	N (1,7±4,7) D (1,7±4,7)	Te (36,9%) T (63,1%)
El Molar	20	0-1230 (401±341)	Tch (6±18,6) N (4,5±14,3) D (1,5±6,5)	Te (23,6%) T (49,5%) Ch (21%) Oe (3,5%) H (2%) C (0,4%)

Tabla XIII. Datos parasitológicos de los animales muestreados en las 8 explotaciones ovinas con infestaciones naturales. N.- **Nematodirus**, M.- **Moniezia**, D.- **Dicrocoelium**, Tch.- **Trichuris**, Cp.- **Capillaria**, T.- **Trichostrongylus**, Te.- **Teladorsagia**, Ch.- **Chabertia**, Oe.- **Oesophagostomum**, C.- **Cooperia**, H.- **Haemonchus**.

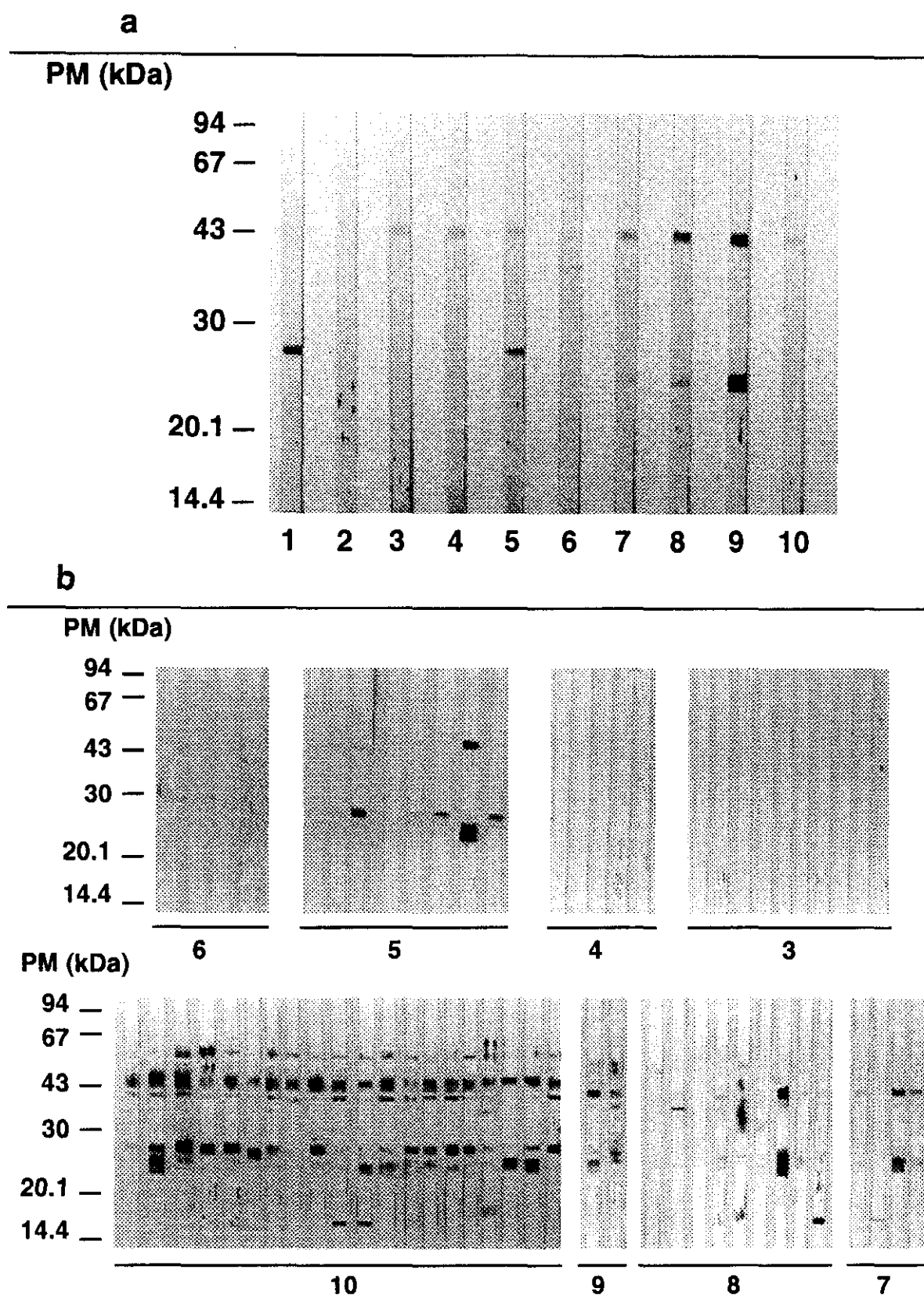


Figura 38. **a.-** Inmunodetección realizada con A4I enfrentada a las mezclas séricas de las distintas explotaciones (1.- control +; 2.- control -; 3.- S. Sebastián de los Reyes; 4.- Torrelaguna; 5.- El Espartal; 6.- El Espartal (bis); 7.- Murcia; 8.- Talamanca del Jarama; 9.- León; 10.- El Molar). **b.-** Inmunodetección realizada con A4I enfrentada a los sueros individuales de las explotaciones muestreadas.

(45 %) reaccionaron con el antígeno de 26 kDa de forma clara mientras el resto no mostró ningún reconocimiento. Las explotaciones restantes no mostraron ninguna reactividad con los sueros individuales. Cuando enfrentamos las mezcla séricas de las distintas explotaciones con A4I únicamente se apreció reactividad en la explotación de "El Espartal", no apareciendo en "El Molar" de forma evidente.

3.2.3.d. Isotipo de las inmunoglobulinas

Se realizó, de igual forma, una inmunodetección con el fin de comprobar los isotipos de inmunoglobulinas que estaban implicadas en el reconocimiento del péptido de 26 kDa empleado como indicador de la infestación. Para ello se enfrentó A4I a mezclas séricas de todos los animales primoinfestados con la dosis de prueba (grupo "1" experimental) así como a mezclas séricas de todos los animales pertenecientes al grupo "0" experimental (día 28 p.i.) y posteriormente se incubaron frente a anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgA y anti-IgM ovinas. Durante el revelado únicamente apareció teñido el péptido de 26 kDa enfrentado a la mezcla sérica de animales primoinfestados y posteriormente revelado con anti-IgG1 ovina, mientras que con el resto de isotipos no se evidenció ningún reconocimiento notable (Fig. 39).

3.3. Aislamiento e identificación del antígeno diagnóstico

A la vista de los resultados obtenidos, se procedió al aislamiento del péptido de ca. 26 kDa de ESA de potencial valor diagnóstico de la hemoncosis ovina, según el esquema que se muestra en la Fig. 40. Para ello, la fracción A4I obtenida anteriormente fue analizada mediante electroforesis desnaturalizante y reductora y posteriormente electrotransferida a una membrana de nitrocelulosa y teñida con rojo Ponceau según se indicó en el Capítulo de Material y Métodos. La región teñida de motilidad electroforética correspondiente a la hallada para la inmunorreactividad de 26 kDa fue cortada y analizada para determinar su secuencia de aminoácidos.

PM (kDa)

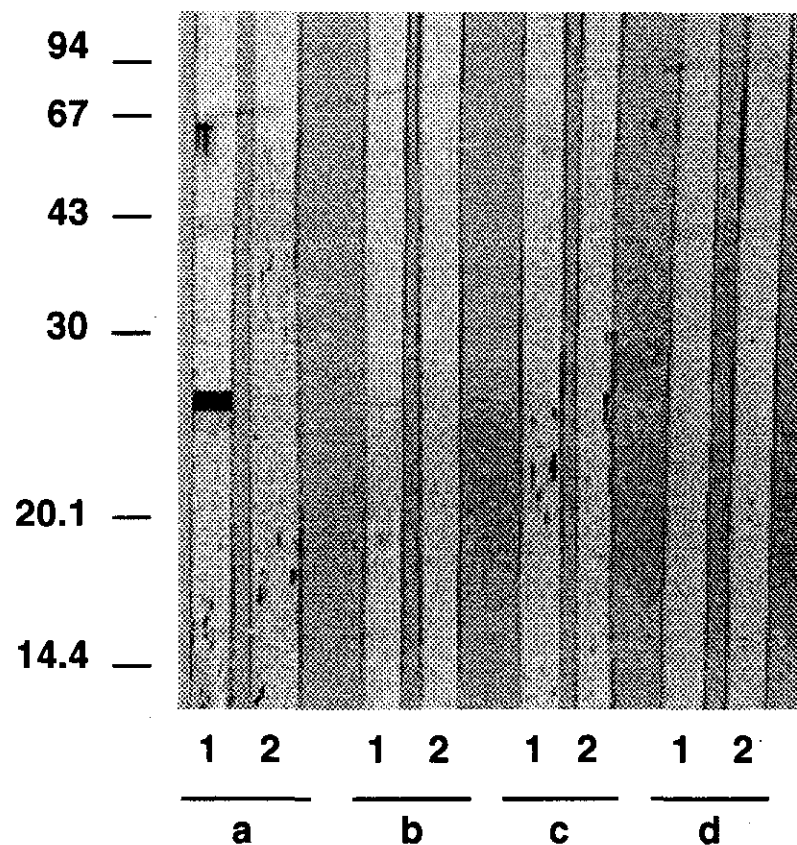


Figura 39. Inmunodetección realizada con A4I enfrentada a mezclas séricas de animales primoinfestados con la dosis de prueba (1) o sin infestar (2) pertenecientes a las cuatro razas ovinas estudiadas el día 42 postinfestación y revelados con anti-sueros anti-IgG₁ (a), anti-IgG₂ (b), anti IgA (c) y anti-IgM (d).

En el análisis realizado (Servicio de secuenciación de Proteínas, C.B.M., Madrid) de la secuencia N-terminal de la región identificada (Fig. 41), se apreció una secuencia múltiple, evidencia de la comigración -por similar motilidad electroforética-de más de un péptido. Se determinaron los primeros 8 aminoácidos de la secuencia principal, que se muestra a continuación, además de una secuencia secundaria.

Secuencia principal: NH₂- **V N Y K L T Y F** (= **Val Asn Tyr Lys Leu Thr Tyr Phe**)

El estudio de la homología de la secuencia principal no pudo ser llevado a cabo por la ausencia de secuencias comparables en los bancos de datos (SWISSPROT y GENEBL). No obstante, en el estudio bibliográfico se apreció que la secuencia poseía una homología muy elevada (87,5%) con una Glutation S-transferasa (GST) de L3 de **H. contortus**. Todos los aminoácidos identificados, excepto el segundo terminal, correspondieron a la GST de L3 de **H. contortus**.

3.3.1. Purificación de GST de **H. contortus** mediante cromatografía de afinidad

Teniendo en cuenta el hallazgo de la homología entre la secuencia principal estudiada y una GST así como la posibilidad de purificar directamente dicha proteína mediante afinidad se procedió a someter al extracto soluble de adultos de **H. contortus** (ESA) a cromatografía de afinidad. Para ello se aplicó ESA a un gel de agarosa unido mediante epoxi activación a glutation en forma reducida (GSH), para posteriormente eluir de forma específica la glutation S-transferasa procedente de adultos de **H. contortus** y ser analizada. El perfil de elución se muestra en la Figura 42, junto con la actividad enzimática detectada mediante unión al sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenceno.

La mayor parte de ESA eluyó al inicio de la cromatografía mientras que otra parte eluyó de forma inespecífica al aplicar 0,5 M de NaCl, y finalmente una pequeña proporción eluyó de forma específica con 5 mM GSH. En la tabla XIV se muestran los porcentajes de recuperación de la enzima (1,28% en ESA), así como el incremento de la actividad específica de la fracción purificada respecto al ESA, con un rendimiento de 70%.

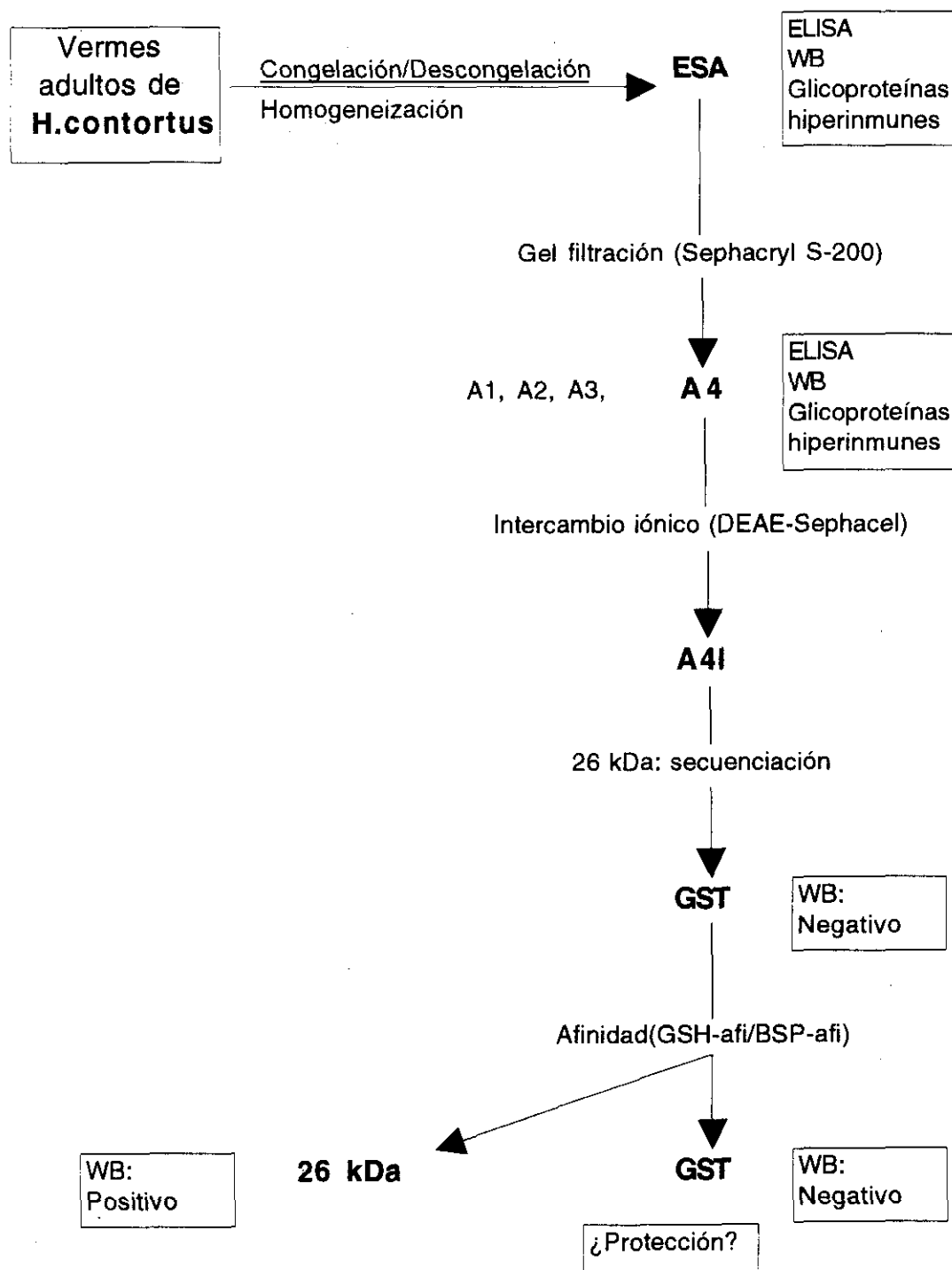


Figura 40. Esquema de purificación del péptido de 26 kDa parcialmente aislado y de GST procedentes de ESA de **H. contortus**.

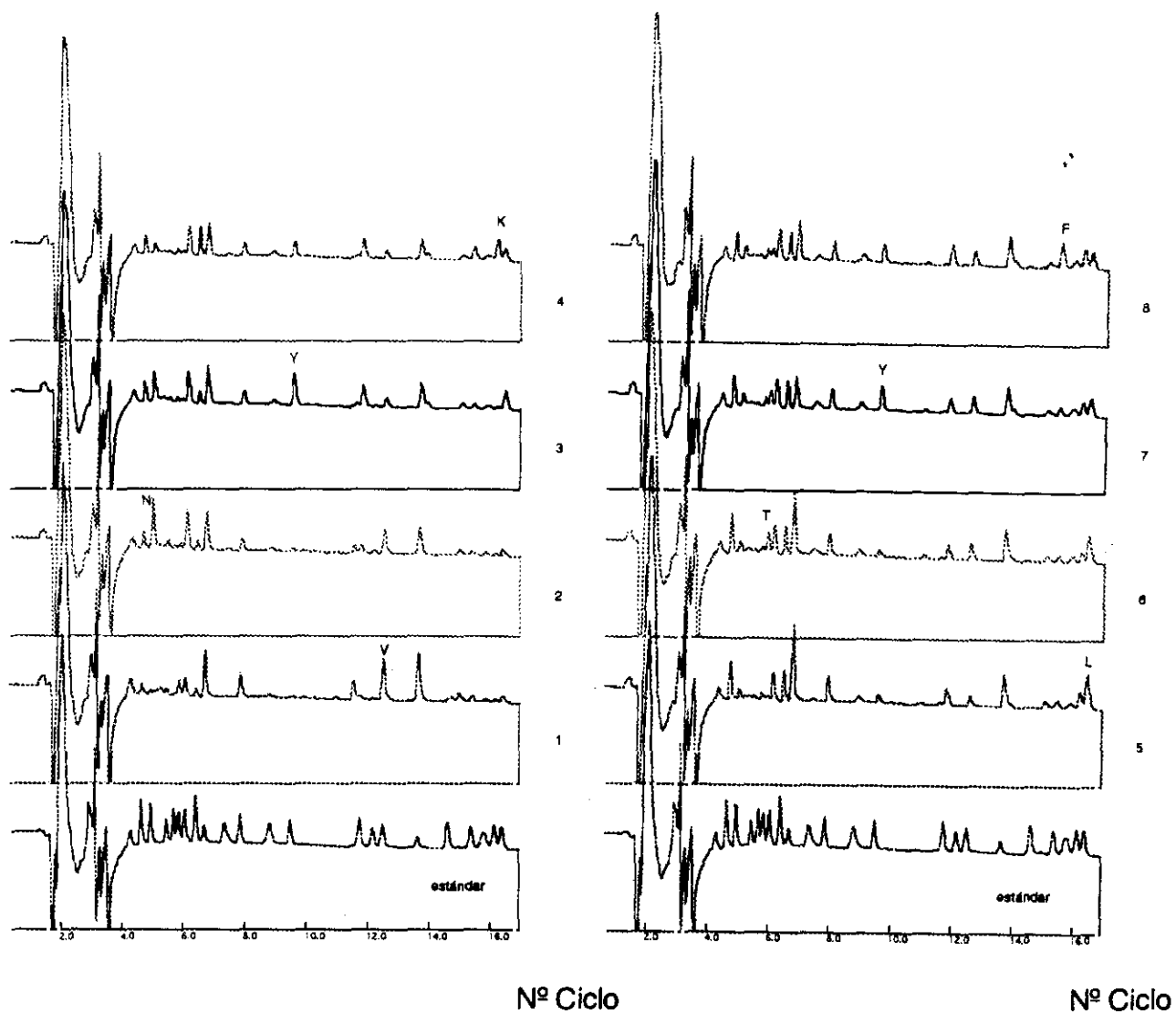


Figura 41. Cromatograma obtenido en la secuenciación N-terminal del péptido de 26 kDa mayoritario en A4I.

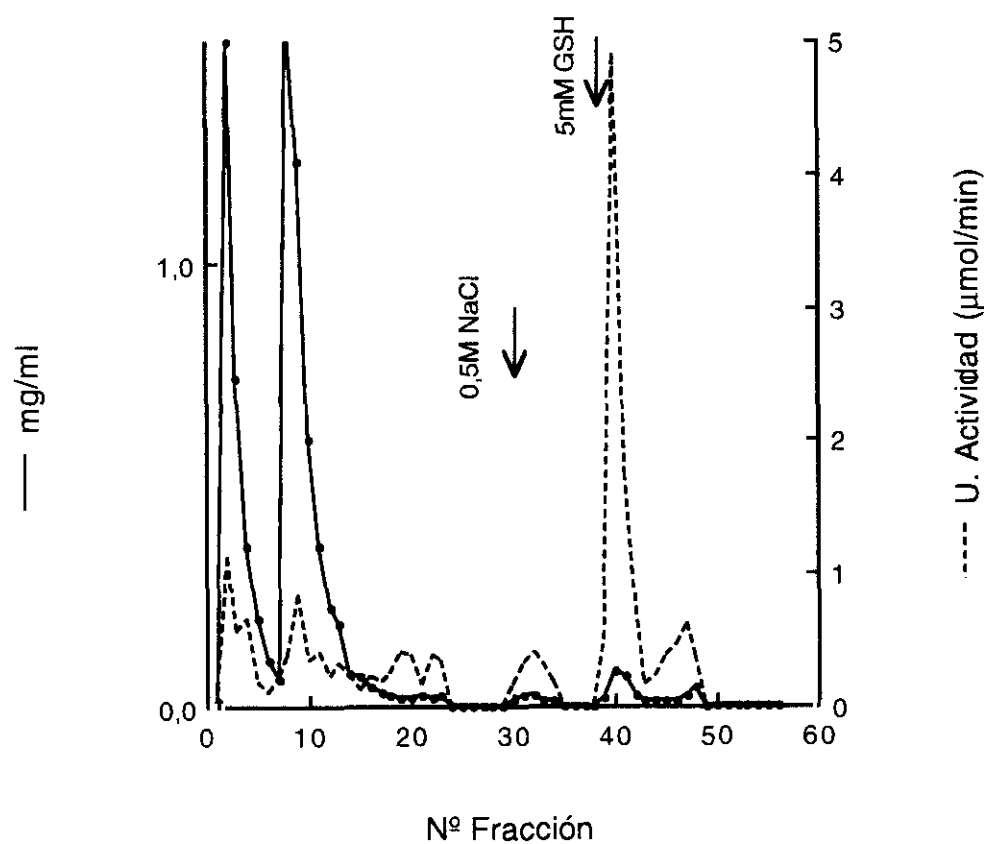


Figura 42. Perfil de elución de la cromatografía de afinidad para la purificación de GST a partir de ESA y eluída con 5 mM de glutathion reducida.

Muestra	mg Proteína	Actividad total ($\mu\text{mol/min}$)	Actividad específica ($\mu\text{mol/min mg}$)	Purificación	Rendimiento
ESA	12,48	6,44	0,52	1	100
no unido	12,17	1,88	0,15	0,3	29,13
NaCl	0,15	0,031	0,21	0,4	0,49
GST	0,16	4,53	28,31	54,9	70,38

Tabla XIV. Purificación de GST a partir de ESA eluído con 5 mM de glutatión reducida, mostrando el rendimiento obtenido.

La Figura 43 muestra el análisis electroforético correspondiente a las fracciones obtenidas tras la cromatografía de afinidad. En la primera fracción de la elución específica se observaron dos bandas peptídicas de PM estimado entre 25-28 kDa, aisladas en la electroforesis desarrollada bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), mientras que en las fracciones siguientes de la elución aparecieron contaminadas con otros péptidos. Se analizó la capacidad diagnóstica de la enzima purificada mediante inmunodetección, sin embargo ninguno de los péptidos apareció reconocido, ni por los sueros de animales no infestados ni por los sueros de animales infestados (no mostrado).

Para comprobar si el péptido de ca. 26 kDa con potencial diagnóstico correspondía a una GST, se procedió a introducir ESA y la fracción A4I en la columna de afinidad, y se eluyó de igual forma, excepto que se utilizó β -mercaptoetanol en la elución, con el fin de reproducir las condiciones desarrolladas normalmente en las electroforesis o evitar cambios conformacionales de la enzima al unirse a la GSH. La Figura 44 muestra el perfil de elución de ESA y en la Figura 45 aparece el cromatograma obtenido con A4I. Las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad realizada con A4I se dializaron frente a PBS, fueron concentradas y analizadas mediante inmunodetección (Fig. 46). Se comprobó que el péptido de 26 kDa de A4I desapareció durante la cromatografía para ser eluido de forma específica, confirmando con ello que correspondía a una GST purificada de **H.contortus** adulto. Sin embargo, este péptido no fue reconocido en las inmunodetecciones realizadas.

Para confirmar este extremo, se recuperó la GST de A4I, empleando otro gel de afinidad con bromosulfaleína (BSP) como sustrato unida a un gel de agarosa mediante activación con bromuro de cianógeno (CNBr). La cromatografía se realizó de igual forma que en los casos anteriores eliminando la unión inespecífica al gel mediante una solución 2M NaCl. La elución del enzima de **H.contortus** se realizó con 50 mM Tris (pH 10,5). El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 47, así como la actividad GST específica detectada.

Se realizaron inmunodetecciones con las fracciones obtenidas y sueros de animales infestados con **H.contortus** utilizados como controles en los casos anteriores (Fig. 48). El péptido con actividad antigénica fue identificado en la fracción no unida al gel de afinidad y no poseía ninguna actividad enzimática GST, lo que confirmó los resultados anteriores.

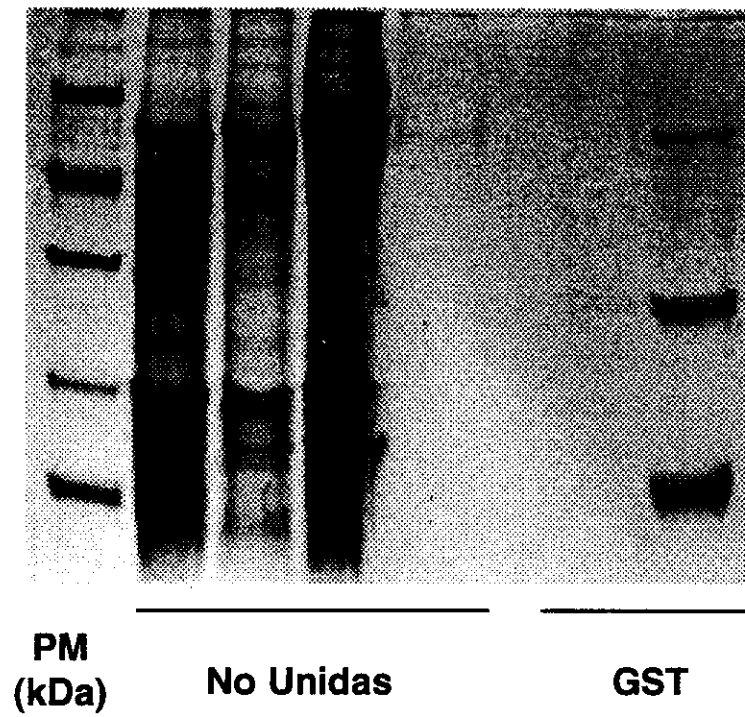


Figura 43.- SDS-PAGE (12,5% acrilamida) realizada con las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad para purificación de GST a partir de ESA y eluída con 5 mM de glutatión reducida.

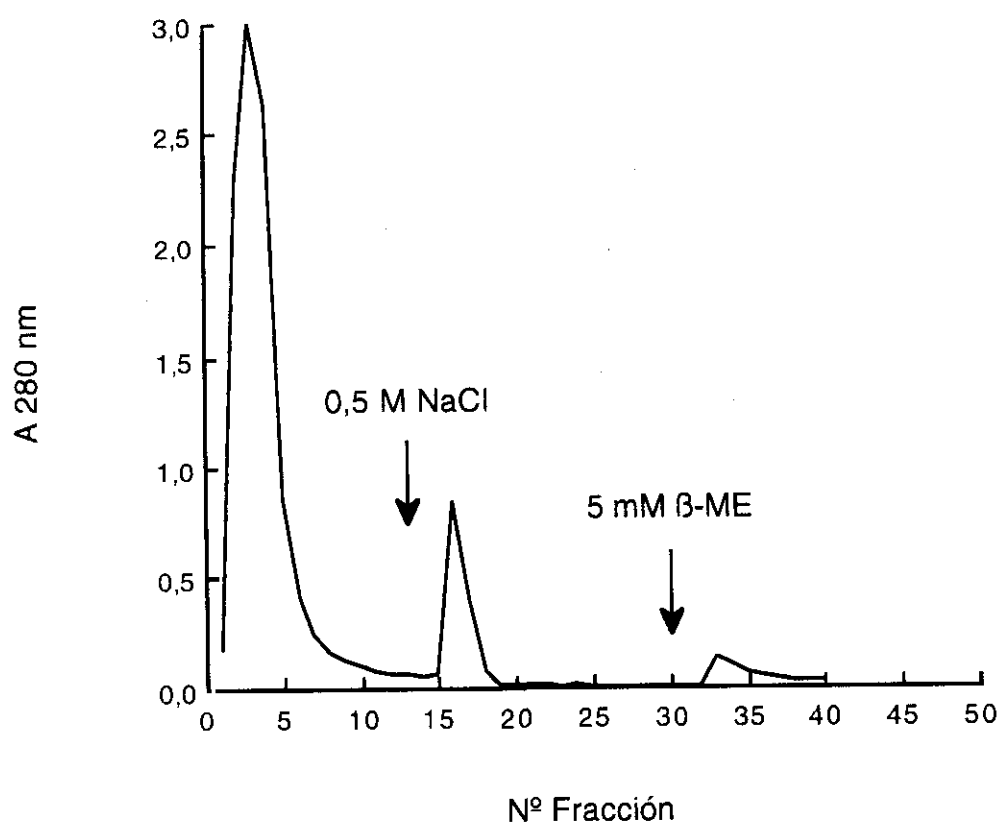


Figura 44. Perfil de elución de la cromatografía de afinidad para la purificación de GST a partir de ESA y eluída con 5 mM de β -mercaptoetanol.

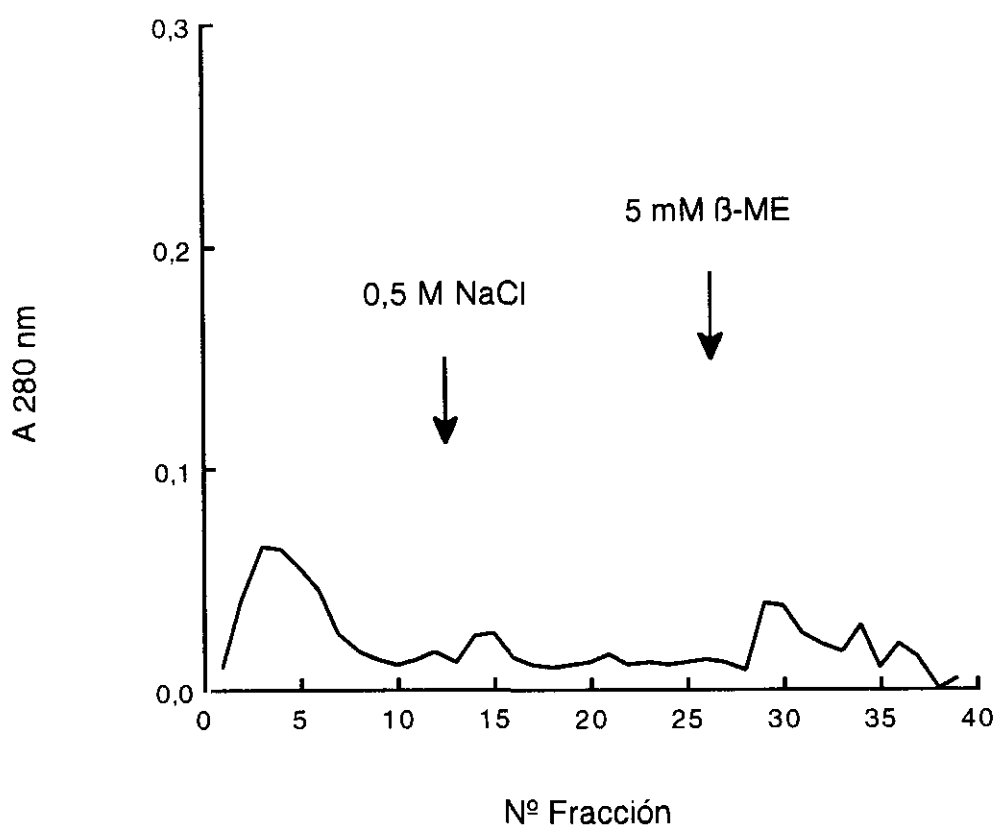


Figura 45. Perfil de elución de la cromatografía de afinidad para la purificación de GST a partir de A4I y eluída con 5 mM de β -mercaptoetanol.

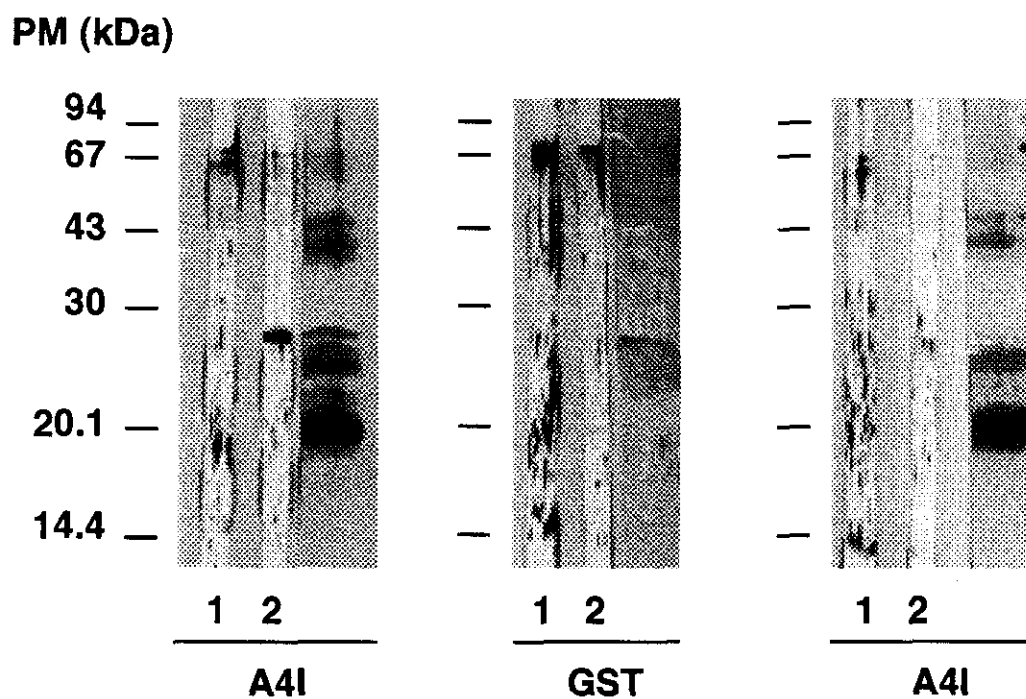


Figura 46. Inmunodetección realizada con las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad realizada con A4I para purificar GST enfrentadas a sueros de animales sin infestar (1) o infestados con *H. contortus* (2). En la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

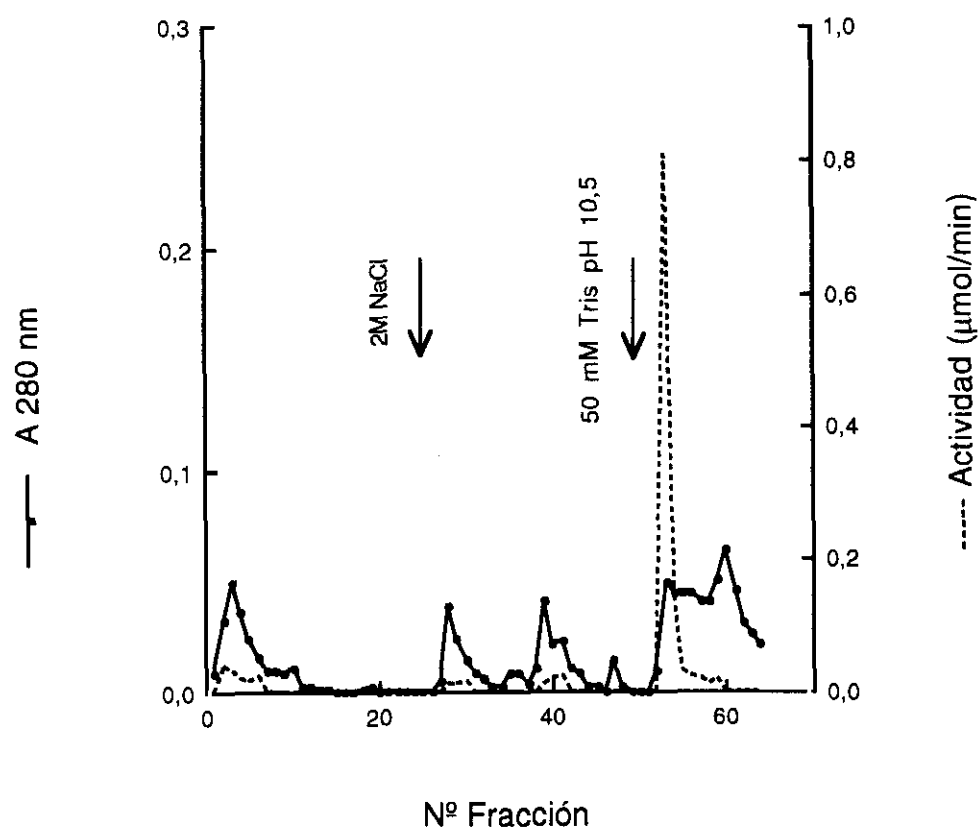


Figura 47. Cromatografía de afinidad para extracción de GST a partir de A4I con el sustrato BSP unido a un gel de agarosa. La elución se realizó con 2M de NaCl y posteriormente a pH=10,5. A la derecha se muestra la actividad de las fracciones obtenidas.

PM (kDa)

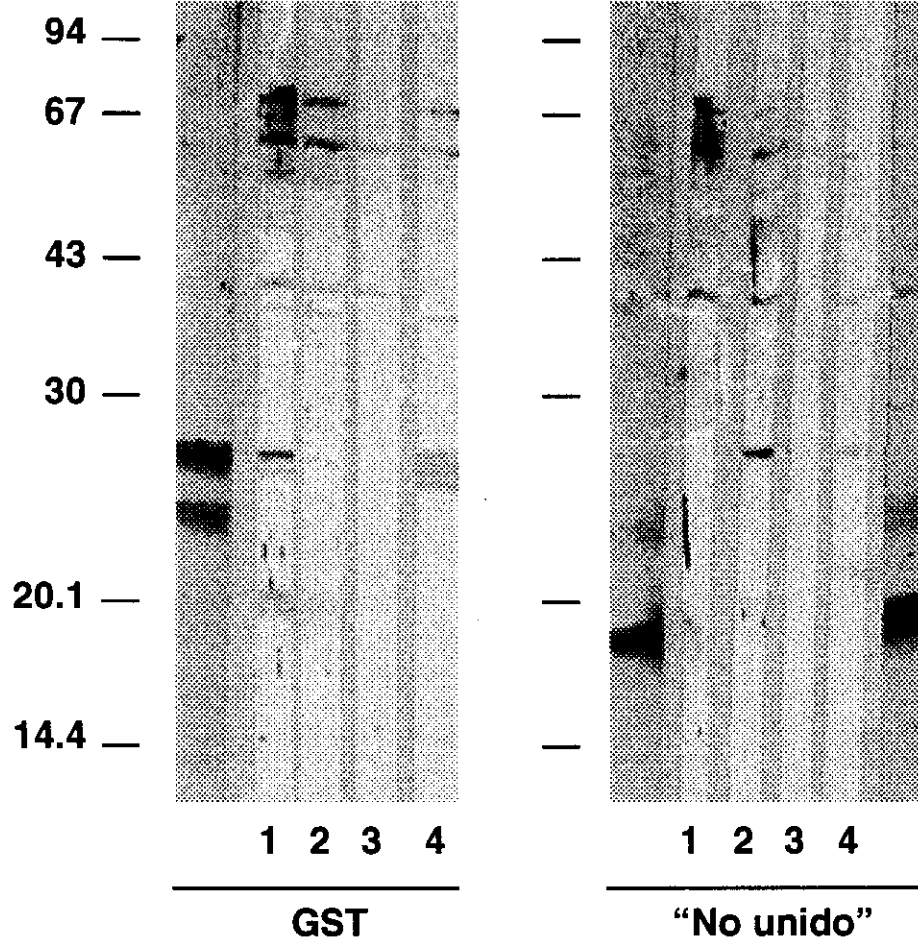


Figura 48. Inmunodetección realizada con las fracciones "no unido" y GST de la cromatografía de afinidad realizada con A4I en el gel BSP-agarosa, enfrentadas a sueros negativos: 1 (n=16) y 3 (n=11), y a sueros positivos: 2 (n=16) y 4 (n=5). En la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular (PM).

La SDS-PAGE de la fracción no unida y su posterior electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa permitió el aislamiento del péptido diagnóstico que se halló en la fracción A4I y su secuenciación N-terminal (Servicio de Secuenciación de Proteínas, CBM, Madrid) (Fig. 49). Los últimos ocho restos aminoácidos del péptido se muestran a continuación: NH₂- **A G L F A H H T**; secuencia principal que muestra gran similitud con la secuencia secundaria originalmente obtenida en la primera secuenciación de la región de 26 kDa de A4I de **H. contortus**.

Tras los ensayos realizados, nuestros resultados mostraron la existencia de dos péptidos comigrantes, de **ca.** 26 kDa, uno de los cuales, tiene valor diagnóstico de la hemoncosis ovina, mientras que el otro aparentemente es una GST, sin valor diagnóstico en nuestras condiciones.

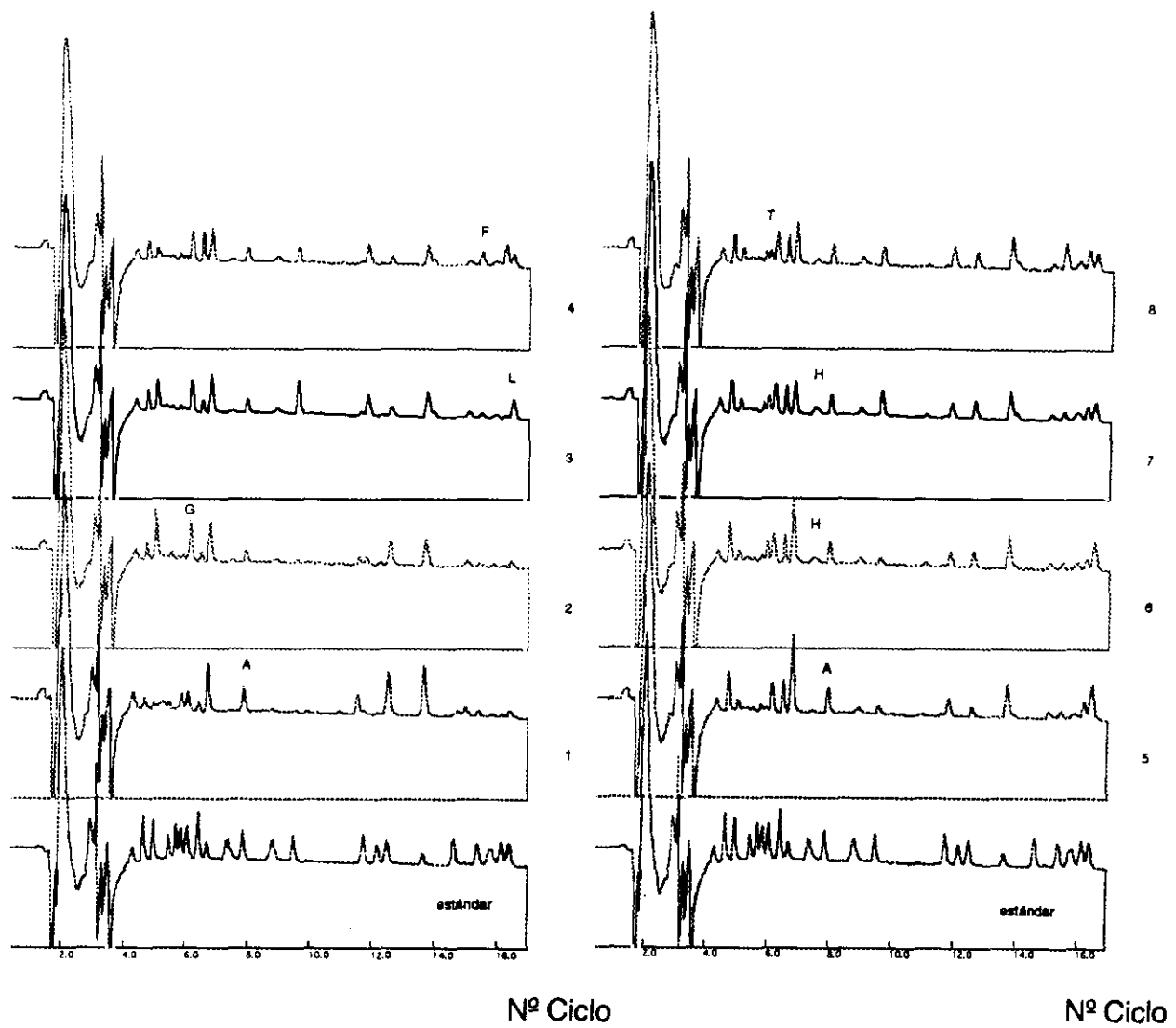


Figura 49. Cromatograma obtenido en la secuenciación N-terminal del péptido de 26 kDa de A4I tras la extracción por afinidad de GST.

4. DISCUSION

4.1. Variaciones raciales en la receptividad a **H.contortus**

La existencia de variaciones individuales y raciales en la relación **H.contortus**-ganado ovino ha sido reconocida desde hace más de 40 años, tras las observaciones de Whitlock (1955). Estas variaciones se han relacionado con distintos parámetros, entre los que merecen ser destacados, el porcentaje de implantación de las dosis infestantes; eliminación de huevos; grado de desarrollo parasitario; relación machos/hembras de la población parasitaria; periodo de prepatencia de las infestaciones; así como la diferente acción patógena del helminto (hipoproteinemia, reducción del hematocrito y otros factores) y la respuesta del ganado ovino infestado (detención del desarrollo, expulsión de vermes, respuesta sérica y local (celular y humoral), entre otros (Radhakrisnan y col., 1972; Courtney y col., 1985a y b; Zajac y col., 1990; Gamble y Zajac, 1992; entre otros).

El tipo de diseño experimental llevado a cabo por nosotros no ha contemplado el sacrificio de los animales que recibieron una primoinfestación con 200 L3/Kg pv, por lo que las variaciones raciales se han estudiado empleando parámetros **in vivo** (niveles de anticuerpos; variaciones de proteínas; eliminación fecal de huevos) en los grupos 1 y 2 y sólo se han podido determinar los parámetros **postmortem** (tasa de implantación, biomasa parasitaria, relación machos/hembras, porcentaje de L4 en la mucosa gástrica) respecto a la adecuación raza ovina estudiada-**H.contortus** en el grupo 1. Por ello, sólo se discutirán en este apartado los parámetros aplicables a la receptividad.

No se apreciaron diferencias raciales notables tras la exposición de los animales a la primoinfestación con 200 L3/Kg pv, ni respecto a los periodos de prepatencia hallados (16-19 días) ni respecto a las eliminaciones fecales de huevos, siendo de hecho los sumatorios de la eliminación total entre los días 21-77 muy similares en

todas las razas estudiadas. Las diferencias observadas en la primoinfestación con 400 L3/Kg pv (Grupo 1) fueron más notables, siendo la raza merina la menos receptiva aparentemente, tanto respecto a su periodo de prepatencia (al menos 18 días) como respecto a las menores eliminaciones de huevos, siendo el sumatorio de los huevos eliminados cerca de un 50% más bajo que en las razas Churra y Manchega y cerca de la tercera parte de los eliminados por la raza Castellana, que aparentemente fue la más receptiva. Los resultados obtenidos por nosotros confirman la mayor eficacia para el estudio de las variaciones raciales del uso de dosis infestantes superiores (Adams, 1982) y el valor del estudio de la eliminación fecal de huevos, por su excelente correlación con la carga parasitaria, en los estudios de receptividad (Kassai y col., 1990).

Los porcentajes de implantación de **H. contortus**, determinados en los animales de los grupos 1, fueron bajos, especialmente en el caso de las razas Merina y Manchega, y en menor medida en la raza Castellana. No existe información publicada sobre las razas autóctonas españolas. No obstante, los valores obtenidos en primoinfestaciones con **H. contortus** en animales de raza Merina valorados, al igual que en nuestro caso, el día 50 postinfestación (ca. 7% en Kassai y col., 1990) resultaron muy similares a los obtenidos en nuestra experimentación en la misma raza (5%).

En otros experimentos se han obtenido implantaciones superiores (Radhakrishnan y col., 1972; Duncan y col., 1978; Adams, 1989; Zajac y col., 1990; Schallig y col., 1995), comparables a los obtenidos por nosotros en la raza Churra (17,6% de valor medio). Las diferencias halladas con los resultados de los estudios mencionados anteriormente podrían deberse a la raza, a la edad de los animales, o a la propia constitución genética de **H. contortus**, resultando en un diferente sistema parásito-hospedador (Adams, 1989). Teniendo en cuenta que, en nuestros ensayos tanto el agente parasitario como la edad del ganado ovino fueron similares, las diferencias de establecimiento comprobadas entre los distintos grupos primoinfestados podrían ser consideradas como expresión de un diferente grado de receptividad. Sin embargo, las variaciones individuales no permitieron apreciar diferencias significativas estadísticamente.

De una forma similar a lo hallado anteriormente, el número medio de vermes mostró variaciones raciales, siendo también la raza Churra la que presentó recuentos superiores (**ca.** 4100 vermes) y las razas Manchega y Merina, las menos receptivas (**ca.** 1000 vermes). La biomasa parasitaria, en relación con la población adulta existente, siguió el mismo patrón ya que no se observaron diferencias notables en el número de machos y de hembras en cada una de las razas ovinas estudiadas.

Los resultados obtenidos en el estudio de la presencia de L4 en la mucosa gástrica han sido particularmente interesantes. De forma inversa a lo obtenido en los resultados del número de vermes adultos, la raza que mostró un menor grado de inhibición del desarrollo -y por ello la más adecuada- fue la raza Churra, mientras que la raza Manchega alcanzó, en ocasiones hasta 465 L4 iniciales en la mucosa gástrica. Se hallaron significativas diferencias raciales, especialmente entre estas dos razas de comportamiento extremo, y menos significativas entre Churra y Merina y Castellana y Manchega.

Considerando globalmente los resultados obtenidos, se han hallado diferencias en la receptividad de las razas ovinas autóctonas estudiadas a **H. contortus**, especialmente en el grado de desarrollo del helminto. Según nuestros resultados la raza Churra parece ser la más receptiva y las razas Merina y Manchega las menos adecuadas. Las diferencias halladas no han resultado tan notables como las encontradas por otros autores, tanto en condiciones experimentales (Courtney y col., 1985a; Gamble y Zajac, 1992) como en condiciones naturales (Preston y Allonby, 1979a; Courtney y col., 1985b; Gamble y Zajac, 1992) entre distintas razas ovinas. No obstante, las diferencias más espectaculares recogidas en la bibliografía se refieren a los estudios comparativos entre razas ovinas altamente resistentes a la hemoncosis, como son St. Croix, Florida native o Red Massai por ejemplo, con otras razas. Nuestros resultados han sido más próximos a los obtenidos por Zajac y col. (1990) y podrían ser relacionados con la localización geográfica relativamente próxima (Altaif y Dargie, 1978 a y b).

4.2. Respuesta protectora a **H.contortus**. Variaciones raciales.

El modelo llevado a cabo por nosotros, infestaciones y reinfestaciones, parece adecuado para el estudio de la resistencia a las infestaciones por helmintos, confirmando así la opinión de Sréter y col. (1994). Todas las razas ovinas estudiadas mostraron, en nuestras condiciones, una respuesta protectora frente a **H.contortus** tras la primoexposición. Esta capacidad de respuesta fue evidente en la menor eliminación de huevos (hpg) de los animales reinfestados con 400 L3/Kg pv, tras la dosis inicial de 200 L3/Kg pv, respecto a los animales del Grupo 1 que sólo recibieron la dosis de prueba; en los inferiores porcentajes de implantación en el abomaso y consiguientemente menor número de helmintos adultos, así como en los superiores niveles de inhibición larvaria (L4) en la mucosa gástrica.

En nuestras condiciones, la resistencia de las razas estudiadas se expresó tanto en el alargamiento de los periodos prepatentes (Byszewska-Spocinska & Stankiewicz, 1985; Courtney y col., 1985a; Gill, 1991; Gamble y Zajac, 1992) como en las reducciones en la eliminación fecal de huevos (hpg) (Adams, 1982, 1993a; Smith y col., 1984; Byszewska-Spocinska & Stankiewicz, 1985; Courtney y col., 1985a; Presson y col., 1988; Gill, 1991; Gamble y Zajac, 1992; Schallig y col., 1994a, 1995a) significativamente menor en las razas Castellana, Churra y, en menor medida, en la raza Merina. En la raza Manchega, a pesar de los menores valores de eliminación por parte de los reinfestados no se observaron significaciones estadísticas por la variación individual. La menor significación en la raza Merina pareció estar relacionada con una resistencia natural en los animales de más edad. Ya que no se efectuaron necropsias inmediatamente después de la infestación, una menor implantación en esta raza no puede ser descartada. Las reducciones más notables en el número de helmintos adultos se hallaron en la raza Castellana, la más reactiva, y en la raza Manchega. El hecho de no hallarse diferencias en la raza Churra estuvo relacionado con la mayor presencia relativa de L4 en esta raza y, en menor medida, de la raza Castellana. La respuesta protectora hallada por nosotros en todas las razas estudiadas puede ser relacionada con la aparición de esta propiedad en animales mayores de 7-8 meses de edad siguiendo el modelo general (Altaif y Dargie, 1978b;

Duncan y col., 1978; Zajac y col., 1990; Coyne, 1992; Kassai y Sréter, 1992) sin la precocidad observada en otras razas (Courtney y col., 1985a; Gamble y Zajac, 1992). No existe información publicada en estas razas salvo las aportaciones de Cuquerella y col. (1994b) en la raza Manchega, donde se observaron reducciones notables en los niveles de hpg pero desgraciadamente no se llevaron a cabo sacrificios al final de la dosis de prueba. Las diferencias observadas en los niveles de inhibición larvaria (L4) en la mucosa gástrica y en el número de adultos de **H.contortus**, al final del experimento parecen mostrar que la respuesta protectora se ha manifestado de forma importante en la detención del desarrollo en las razas Castellana y Churra. Los niveles hallados en la raza Manchega a pesar de ser muy elevados, también lo fueron en los animales sin infestación previa. Este incremento significativo podría ser considerado como expresión del estado reactivo de los ovinos preinfestados (Altaif y Dargie, 1978b; Miller, 1984; Barger y col., 1985; Schallig, 1995a). Los resultados hallados en la raza Merina sugieren la existencia de una expulsión rápida. Desgraciadamente ya que no se realizaron sacrificios seriados y el número de animales fue escaso, los hallazgos requieren ulterior confirmación.

4.3. Respuesta sérica a **H.contortus**

En los estudios inmunológicos llevados a cabo se emplearon, en los ELISA, dos fuentes antigénicas (ESL y ESA). Los resultados obtenidos con ambos extractos fueron similares aunque, en genral, los valores obtenidos con ESL fueron superiores a los hallados con ESA. La diferente antigenicidad de distintas fuentes (ESA, ESL, antígenos de excreción/secreción) ha sido ampliamente referenciada y nuestros resultados se hallan en la línea de los obtenidos anteriormente (Byszewska-Spocinska & Stankiewicz, 1985; Cuquerella y col., 1991; Adams, 1993; Schallig y col., 1994a, 1995a) a pesar de adscribirse a los productos de **H.adultos** un superior poder inmunizante (Munn y col., 1987; Adams, 1989).

La comparación de los resultados obtenidos por nosotros en el estudio de la respuesta de anticuerpos anti-**Haemonchus** es extraordinariamente difícil teniendo en

cuenta la variabilidad de los hallazgos en dependencia de la edad de los animales, raza y genotipo, fuente antigénica empleada, así como las dosis infestantes empleadas y las infestaciones previas (Duncan y col., 1978; Byszewska-Spocinska & Stankiewicz, 1985; Cuquerella y col., 1991; Gill, 1991; Schallig y col., 1994a, 1995a; entre otros), así como la falta de información sobre las razas estudiadas.

Los resultados obtenidos han mostrado, en general, una escasa respuesta sérica durante las primoinfestaciones realizadas con dosis larvarias moderadas (200 L3/Kg pv), resultados comparables a los hallados previamente en diferentes razas ovinas (Manchega, Préalpes du Sud, Merino y Scottish Blackface) (Cuquerella y col., 1991; Charley-Poulain y col., 1984; Adams y Beh, 1981 y Smith, 1977b respectivamente). Sin embargo, cuando se emplearon dosis larvarias superiores (400 L3/Kg pv) en las primoinfestaciones sí se halló una respuesta sensiblemente superior en algunas ocasiones, lo que confirma el carácter dosis-dependiente de la respuesta sérica observado (Smith, 1977b; Duncan y co., 1978; Smith y col., 1987; Cuquerella y col., 1994b; Schallig y col., 1994a y b; 1995a). Hemos de señalar que los niveles de anticuerpos séricos, en particular las IgG, fueron elevándose de forma inespecífica a lo largo del periodo experimental, en relación con el incremento de edad, hecho este también observado por otros autores que estudiaron la respuesta sérica provocada por las infestaciones experimentales con **H. contortus** en la raza Texel (Schallig y col. 1994a) y que podría ser interpretado por la aparición de reacciones cruzadas con antígenos bacterianos o de otro origen a lo largo de la vida del ganado ovino.

Aunque los valores de IgG séricas anti-**Haemonchus** fueron discretos en las cuatro razas autóctonas estudiadas por nosotros se apreció la existencia de algunas diferencias sensibles entre ellas. De una parte, se observó una respuesta secundaria en la raza Castellana, tanto empleando ESL como ESA, y en menor medida en la raza Churra. Por su parte, la respuesta en el ganado Merino y Manchego fue dosis-dependiente, hecho observado previamente en esta última raza anteriormente (Cuquerella y col., 1991; Cuquerella y col., 1994b). Según se ha indicado, la comparación de estos resultados es dificultosa ya que no existe información previa y los diseños experimentales han sido, en ocasiones, muy diferentes.

Hemos de destacar que, en general, los niveles de inmunoglobulinas, de todos los isotipos estudiados, fueron similares a los obtenidos por otros autores (**vide supra**) y mucho más bajos que los obtenidos en ocasiones (p.e. Smith, 1977b). Los menores niveles pueden ser explicados por el sistema de infestación empleado. Nuestro diseño experimental contempló la administración del inóculo infestante (L3 de **H.contortus**) en dosis únicas, mientras que en los ensayos en los que se han obtenido niveles muy elevados éstos se lograban por la administración continua de L3 (Byszewska-Spocinska & Stankiewicz, 1985; Schallig y col., 1994; entre otros). En este sentido, Smith (1977b) observó que la respuesta sérica anti-**Haemonchus** sólo se mantenía durante la administración de dosis larvarias, cesando cuando se detenían las infestaciones. Este hallazgo también ha sido obtenido por nosotros, al observarse niveles más elevados en el ganado ovino que recibió dos infestaciones (Grupo 2; 200 L3/Kg pv + 400 L3/Kg pv).

Los bajos niveles de inmunoglobulinas séricas anti-**Haemonchus** hallados por nosotros y otros autores, además de con la dosis infestante y calendario de infestaciones, podrían ser relacionados con la menor capacidad del abomaso de presentación de antígenos, respecto al intestino delgado al poseer éste un superior número de estructuras (Placas de Peyer) y células (linfocitos de la mucosa y enterocitos) especializadas (Husband, 1985). De hecho, Duncan y col. (1978) habían sugerido que el abomaso era lento en el desarrollo de una respuesta local. Evidencias adicionales son suministradas por el hecho de que las infestaciones por nematodos gastrointestinales de rumiantes que comparten localización con **H.contortus**, tales como **Te.circumcincta**, no provocan elevaciones muy notables de inmunoglobulinas específicas (Cuquerella y col., 1994a; Douch y col., 1995), mientras que en los estudios de antigenicidad cruzada en todos los casos la respuesta desarrollada frente a nematodos entéricos (**T.colubriformis**) fue considerablemente superior que la hallada frente a **H.contortus**, tanto en estudios puntuales (Schallig y col., 1994b) como en estudios seriados (Cuquerella y col., 1994a).

La disponibilidad relativamente reciente de reactivos ha permitido el estudio de los isotipos implicados en la respuesta anti-**Haemonchus** e el ganado infestado. En nuestras condiciones, el papel de las IgG2 fue aparentemente muy escaso ya que no

se hallaron incrementos notables en ninguna de las razas estudiadas ni tampoco en relación al hecho de haber recibido una o dos infestaciones con el helminto, situación también observada por Gill y col. (1993). El estudio de los niveles de de IgG1 específicas, sin embargo, mostró que sus perfiles fueron similares a los hallados cuando se valoraron las IgG totales, resultados comparables a los obtenidos en otras razas ovinas (Gill y col., 1993; Schallig y col., 1994a, 1995a) y que sugieren el posible papel de este isotipo en la hemoncosis. Estos resultados son consistentes con el hecho de que en rumiantes constituyen aproximadamente el 90% de las IgG séricas, además de ser relevantes en las mucosas, tars las IgA (Lascelles y col., 1986).

Del mismo modo que en el caso de las IgG2 anti-**Haemonchus**, el papel de las IgM aparentemente fue muy escaso en las cuatro razas ovinas estudiadas por nosotros al no hallarse variaciones en relación a las infestaciones administradas. Las alteraciones menores halladas fueron generales y presumiblemente, por ello, debidas a reacciones inespecíficas. esta reactividad también ha sido hallada por Schallig y col. (1995a) y podría ser relacionada con reacciones cruzadas debidas a epítomos como la fosforilcolina, compartidos con otros organismos tales como bacterias o incluso nematodos de vida libre. La falta de significación de este isotipo ha sido observada en ganado Merino australiano de dos genotipos y comportamiento parasitológico muy diferente frente a **H.contortus** (Gill y col., 1993), además no desempeñar ningún papel relevante en la respuesta local en abomaso (Gill y col., 1994). Alternativamente, los ELISA para la valoración de IgM son, en muchas ocasiones, de difícil interpretación.

Por el contrario, la respuesta IgA anti-**Haemonchus** estuvo claramente relacionada con las infestaciones por el helminto. Al igual que sucedió en el caso de las IgG séricas y, en particular de las IgG1, la respuesta IgA sérica frente al ESL resultó ligeramente superior que la que se originó frente al ESA en líneas generales, con algunas variaciones en dependencia de la raza ovina. Resultados similares han sido obtenidos por Schallig y col. (1994a, 1995a) en animales de raza Texel. Con independencia del extracto antigénico empleado la respuesta originada resultó dosis-dependiente en las razas Castellana, Churra y Manchega, con un incremento importante en los títulos de IgA sérica en los dos grupos experimentales (grupos 2 y

1) a partir del día 14 tras la infestación con la dosis de prueba. En la raza Merina, sin embargo, podemos comprobar en todo momento mayores niveles de IgA en el suero del grupo de animales que sufrieron dos infestaciones (Me2).

El papel de las inmunoglobulinas en la respuesta protectora del ganado ovino frente a las infestaciones por **H.contortus**, así como por otros helmintos gastrointestinales, ha sido ampliamente discutido (Smith, 1977; Duncan y col., 1978; Smith y col., 1987; Gilly col., 1993; entre otros). Nuestros resultados no han resultado concluyentes sobre relevancia de las inmunoglobulinas específicas en la protección del ganado ovino. A pesar de los diferentes tipos de respuesta frente al parásito encontradas en ocasiones, involucrando, en algunos casos, detención de desarrollo o bien eliminación casi completa de la población parasitaria en los animales que sufrieron exposición previa al parásito, no se observaron diferencias dramáticas en la respuesta sérica, a excepción quizás de los resultados obtenidos en la raza Castellana, considerando las IgG séricas; estos resultados son comparables a los obtenidos por Gamble y Zajac (1992) en un estudio comparativo con dos razas ovinas de comportamiento extremo frente a **H.contortus**. No obstante, y al igual que estos autores, se hallaron generalmente los valores más altos en la raza que mayor respuesta protectora frente al parásito mostró. Previamente, en la raza Manchega se obtuvieron resultados similares (Chquerella y col., 1994b). La falta de correlación entre protección y niveles de anticuerpos ha sido también apoyada por Luffau y col. (1990) y Sréter y col. (1990).

Por el contrario, algunos autores parecen atribuir algún papel en la protección a las IgG, tanto en el suero como en el abomaso (Smith y Christie, 1978; Duncan y col., 1978), y más específicamente a la IgG₁, puesto que en animales genéticamente resistentes a la hemoncosis se hallaron valores superiores de este anticuerpo junto con la IgA sérica, mientras que los niveles de IgM e IgG₂ no variaron entre ambos grupos (Gill y col., 1993). Esto parece confirmarse parcialmente en nuestro estudio, puesto que los mayores incrementos de IgG₁ específica se presentaron en general en los animales que mostraron algún grado de protección frente a la hemoncosis (grupo 2). Además, las mayores diferencias en los incrementos séricos de IgG₁ entre el grupo 2 y el grupo 1 se encontraron en dos razas con elevados niveles de protección

(Castellana y Churra), que además mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales en el número de vermes encontrados en la necropsia de los animales, así como en la biomasa parasitaria o porcentaje de implantación de vermes adultos. Por otra parte, dentro de la raza Merina, en la que las hembras mostraron una capacidad de respuesta muy elevada frente a la hemoncosis, se hallaron incrementos notables de IgG séricas específicas (frente a ESA y ESL) en este sexo, mientras que los machos no modificaron sus niveles de anticuerpos en el suero, coincidiendo con su escaso grado de protección.

La relación de los niveles de anticuerpos de producción local (IgA) con la respuesta efectiva frente a la hemoncosis, así como frente a otras tricostrongilidosis, se ha planteado en numerosos estudios (Smith, 1977b; Smith y Christie, 1978; Duncan y col., 1978; Smith y col., 1987), atribuyéndole en ocasiones una clara relación con la reacción de autocura (Charley-Poulain y col., 1984). En los enzimoimmunoensayos realizados por nosotros en la raza Merina, donde 3 de los animales pertenecientes al grupo que recibió dos infestaciones (Me 2) fueron capaces de eliminar parcialmente su población parasitaria en la fase final de la primoinfestación, aparecieron incrementos de IgA ESA-específica coincidiendo en el tiempo con el descenso evidente de recuentos de huevos fecales. Además, durante la segunda infestación mostraron títulos de IgA sérica superiores en todo momento al grupo Me 1, coincidiendo este hecho con la práctica refractariedad a la infestación mostrada por estos 3 animales. Cabe señalar también que dentro del mismo grupo experimental (Me 2) se encontraron otros 3 animales (los machos) que no mostraron ninguna respuesta efectiva frente a **H. contortus**, y por lo tanto, los títulos correspondientes a estos animales podrían enmascarar la respuesta total del grupo. En estudios recientes sobre la respuesta IgA en ganado Merino genéticamente resistente a la hemoncosis, así como animales de raza Merina escogidos al azar, se han hallado diferencias significativas en los niveles de este isotipo tanto en el suero como en extractos fecales entre ambos grupos, encontrando además una correlación negativa entre IgA (sérica y fecal) y los recuentos de huevos en las heces en ambos genotipos (Gill y col., 1993). Asimismo, en estudios posteriores los mismos autores comprobaron un mayor incremento de células con IgA específica en la mucosa del abomaso en los animales genéticamente resistentes verificando la importancia de este anticuerpo en

la respuesta frente a la hemoncosis (Gill y col., 1994).

Finalmente, hay que destacar que es posible que no existe una relación estrecha entre protección y niveles de anticuerpos al estar ligada la resistencia a mecanismos celulares, mucho menos investigados. Alternativamente la aparente inconsistencia podría estar relacionada con la utilización en general de mezclas antigénicas muy complejas que podrían enmascarar la importancia en la protección de la respuesta frente a algunos antígenos

4.3. Diagnóstico inmunitario de la hemoncosis.

El establecimiento de un diagnóstico rápido, específico y precoz en la hemoncosis ovina es necesario y útil en numerosas determinaciones, tales como pruebas vacunales, estimación de la resistencia a antihelmínticos, etc, evitando esperas innecesarias y el requerimiento de personal altamente especializado. Los intentos realizados hasta el momento de realizar diagnósticos inmunitarios de las infestaciones primarias con **H. contortus** han quedado restringidos a una determinada zona geográfica, o bien no resultaron homogéneos al comparar animales de diferente edad o pertenecientes a distintas razas ovinas. En muchos casos, la alta reactividad cruzada encontrada entre **H. contortus** con otros nematodos relacionados (Cuquerella y col., 1993; Anderson y col., 1988; Schallig y col., 1994b) o no relacionados (Shamansky y col., 1989) ha determinado la carencia de un diagnóstico específico.

La falta de interés en los extractos solubles del parásito quizás sea debida a la baja inmunogenicidad sugerida (Parkhouse y col., 1987), especialmente en el caso de los extractos procedentes de adultos de **H. contortus**, ya que ha sido sugerido en numerosas ocasiones la mayor respuesta de anticuerpos provocada por los extractos larvarios (Adams 1993; Byszewska-Spocynska y Stankiewicz, 1985; Schallig y col., 1994a, 1995a). En nuestro caso, se confirmaron estos resultados, apareciendo el ESL con mayor capacidad antigénica; sin embargo, no se detectó ningún antígeno con valor diagnóstico procedente de los extractos larvarios, mientras que se identificó un

antígeno con valor diagnóstico de las hemoncosis en los extractos solubles de adulto. Por otra parte, la baja y diversa respuesta de anticuerpos provocada por los extractos solubles podría deberse a la gran complejidad antigénica que presentan y la solución sería el empleo de antígenos purificados (Charley-Poulain y col., 1982). A pesar de que se ha realizado algún intento de caracterización de extractos solubles parasitarios (Neilson, 1969, Ozerol y Silverman, 1969, 1970) así como de proteínas cuticulares (Cox y col., 1989; Shamasnky y col., 1989; Gamble y col., 1990), no se identificó en estos estudios ningún péptido de interés inmunitario.

Por otra parte, ha quedado demostrado, tanto en estudios puntuales (Hendrikx, 1990; Cuquerella y col., 1991) como en estudios seriados (Cuquerella y col., 1993) que determinadas proteínas parasitarias son reconocidas por animales infestados, especialmente dos péptidos de **ca. 25-26 kDa** (Cuquerella y col., 1993), siendo, además, reconocidos en infestaciones primarias por corderos de escasa edad. Estudios recientes desarrollados por Schallig y col. (1994b) mostraron resultados similares, identificando un péptido de 24 kDa en los productos de excreción/secreción procedentes de vermes adultos del parásito, que resultó reconocido en momentos puntuales por animales primoinfestados o bien que habían sufrido infestaciones anteriores. Estos resultados, sin embargo, se han realizado en animales pertenecientes a una sola raza ovina (Manchega o Texel), no existiendo comparación ni entre ambos antígenos, ni entre diferentes razas ovinas, por lo que la necesidad de establecer un diagnóstico de la hemoncosis con valor interracial es evidente.

4.3.1. Identificación y aislamiento de antígenos diagnósticos.

Hasta el momento, los intentos de realizar diagnósticos basados en la detección directa de antígenos parasitarios no han tenido éxito, o bien su coste resulta poco económico en la aplicación de las pruebas. La detección de antígenos circulantes en el torrente sanguíneo derivados del parásito sería de gran utilidad, pudiendo incluso emplearse como indicador de la tasa de infestación que sufren los animales, sin embargo se han realizado escasas pruebas al respecto y los resultados no fueron lo

esperado (Pétit y col., 1981). Tampoco la detección de antígenos en las heces de los animales infestados ha sido capaz de diferenciar de forma clara animales con cargas elevadas del parásito, apareciendo en las muestras fecales procedentes de estos animales y las procedentes de animales con cargas leves cantidades de antígeno similares en los enzimoimmunoensayos desarrollados (Ellis y col., 1993). Más éxito se alcanzó con las pruebas desarrolladas con material genético con el fin de diferenciar especies de nematodos tricostrongídeos emparentados (Christensen y col., 1994; Roos y Grant, 1993). Sin embargo, el empleo de estos métodos resulta de poca utilidad práctica tanto por su elevado coste como por la necesidad en ocasiones de esperar al periodo de prepatencia para obtener material parasitario y realizar los ensayos.

Por lo anteriormente expuesto queda claro que los métodos de diagnóstico inmunológico indirecto, en este caso la detección de anticuerpos de animales infestados dirigidos a proteínas antigénicas del parásito, esta resultando de gran utilidad, identificando antígenos (24-26 kDa) procedentes de vermes adultos del parásito que son detectados de forma específica, mediante inmunoimprontas, durante las infestaciones por **H. contortus** (Cuquerella y col., 1993, 1994; Schallig y col., 1994b). Aunque los extractos solubles enteros del parásito se han empleado a veces con finalidad diagnóstica, ni estos ni las proteínas de excreción/secreción que aparecieron con ligeros incrementos en la sensibilidad y especificidad del método ELISA desarrollado son suficientemente fiables para poder aplicarlos en animales de diferente edad, raza, o bien con distinta localización geográfica, especialmente en animales con infestaciones naturales donde las infestaciones mixtas son la norma (Schallig y col., 1995). La necesidad de identificar y aislar los antígenos diagnósticos mencionados anteriormente nos llevó a realizar caracterizaciones de los extractos solubles empleados por nosotros.

En las fracciones obtenidas mediante gel filtración e intercambio iónico del ESL no se identificó ningún antígeno de interés diagnóstico. Además, los intentos realizados por nosotros de emplear material parasitario soluble en detergentes, aunque no mostrado, resultaron en incrementos interesantes en la sensibilidad de los enzimoimmunoensayos, aunque la especificidad disminuyó drásticamente, apareciendo

de forma general mayores reconocimientos, tanto en EIA como en inmunoimprontas, por parte de los animales infestados con **T. colubriformis**. Todas estas consideraciones hicieron que nuestros esfuerzos se centraran fundamentalmente en la caracterización del ESA de **H. contortus**.

Las fracciones obtenidas por nosotros a partir del ESA, tanto mediante gel filtración como mediante cromatografía de intercambio iónico, fueron analizadas con los sueros de animales que sufrían infestaciones homólogas y heterólogas, así como de animales sin infestar mediante enzimoimmunoensayos. Se detectó una alta reactividad cruzada entre los sueros homólogos y heterólogos, particularmente los procedentes de animales con infestaciones por **T. colubriformis**. Estos resultados se confirmaron en las inmunodetecciones realizadas con el material parasitario fraccionado mediante electroforesis, y confirmaron la gran reactividad cruzada encontrada por otros autores entre estos y otros nematodos gastrointestinales (Cuquerella y col., 1994; Schallig y col., 1994b, 1995). Además, el enfrentamiento de los extractos solubles (ESL y ESA) de **H. contortus** a los sueros hiperinmunes frente a extractos solubles de éste y otros nematodos relacionados, realizado por nosotros tanto en EIA como en inmunoimprontas, ha demostrado la existencia de una gran cantidad de antígenos compartidos entre los nematodos empleados en nuestros estudios. Por otra parte, las reacciones detectadas en el ESA por los animales no infestados podría explicarse por la presencia de inmunoglobulinas en los extractos parasitarios, tanto de **H. contortus** como de otros nematodos presentes en el abomaso o incluso de localización pulmonar, lo que también explicaría una serie de reactividades no específicas en infestaciones experimentales, pero sobre todo naturales donde generalmente suelen producirse de forma mixta (Murray y Smith, 1994). Se ha señalado, asimismo, la presencia de fosforilcolina en los extractos del verme, lo que complica más aún la presencia de reacciones inespecíficas (van Leeuwen y col., 1992; Péry y col., 1974).

La elección de las fracciones, basándonos en los incrementos de sensibilidad y especificidad, así como en la presencia del antígeno de 26 kDa detectado en ensayos anteriores (M. Cuquerella, Tesis doctoral), nos llevó a seleccionar una fracción (A4I) que resultó contener un escaso número de proteínas, las cuales resultaron no ser compartidas al menos antigénicamente con **T. colubriformis**, ni en su estado adulto,

ni en el larvario, según se demostró enfrentándolas a los sueros hiperinmunes anti-ESL y ESA del mencionado parásito. Por otra parte, a pesar del gran reconocimiento de A4I por parte de los sueros anti-ESL y ESA de *Te. circumcincta* (??), estos antígenos comunes no parecen reconocerse de forma predominante durante las infestaciones experimentales con *Te. circumcincta* puesto que los corderos no reconocieron especialmente la fracción. Hay que señalar, además, que el antígeno de 26 Kda señalado como diagnóstico únicamente resultó reconocido por el suero anti-ESA de *H. contortus*, no apareciendo ninguna detección en las inmunoimprontas realizadas con los sueros hiperinmunes frente a ESL de los vermes pertenecientes a las 3 especies, así como tampoco fue reconocido por los sueros anti-ESA de las especies heterólogas. La elección de un antígeno específico es fundamental, especialmente si no es compartido por las especies mencionadas, ya que en varios estudios han resultado las más complicadas en los enzimoimmunoensayos realizados (M. Cuquerella, Tesis doctoral ; Schallig, 1994b, 1995).

Una característica importante del antígeno es la de no estar aparentemente glicosilado, como se ha demostrado en las pruebas realizadas, tanto con el ESA como con los diferentes fraccionamientos realizados a partir del mismo. La presencia de azúcares en las muestras proteicas puede producir reconocimientos no deseados. En las detecciones de glicoproteínas realizadas con las fracciones procedentes de intercambio iónico del ESA se mostró un reconocimiento homogéneo en las inmunodetecciones de algunos antígenos aparentemente glicosilados por parte de todos los sueros empleados, homólogos y heterólogos.

La similitud de reconocimiento antigénico detectado entre nuestras inmunoimprontas y las realizadas por Schallig y col. (1994b) con productos de excreción/secreción o bien Takáts y col. (1995) empleando extractos proteicos procedentes del esófago, apuntan hacia una coincidencia del antígeno mencionado por ambos grupos, ya que su peso molecular resultó, asimismo, similar. La localización del antígeno en el esófago podría explicar el alto reconocimiento detectado por la inmunoglobulina de tipo G₁, ya que esta región anatómica del parásito es la que está más directamente en contacto con el torrente circulatorio del hospedador. Sin embargo, cuando enfrentamos la fracción A4I al suero hiperinmune anti-24 kDa, nuestro antígeno no

resultó reconocido, así como tampoco fue reconocido cuando se aisló mediante cromatografía de afinidad, lo que apunta a que probablemente se trate de antígenos con diferentes características estructurales.

4.4. Validez diagnóstica del antígeno de 26 kDa de **H. contortus**.

La respuesta inmunitaria desarrollada por animales jóvenes (2-4 meses de edad) ha resultado insuficiente en numerosos estudios, mientras que los animales de mayor edad fueron capaces de responder de forma adecuada (Cuquerella y col., 1991, 1993; Hendrikx, 1990; Duncan y col., 1978; Urquhart y col., 1966). La incapacidad de los animales jóvenes se ha comprobado en varias razas ovinas incluídas en los estudios mencionados anteriormente: Manchega, Scottish blackface, Texel.... Los estudios desarrollados anteriormente por nosotros, así como por otros autores, en la búsqueda de antígenos con capacidad diagnóstica de la hemoncosis, se realizaron en animales de entre 6 y 10 meses de edad (Cuquerella y col., 1993; Schallig y col., 1994b). En nuestro estudio, sin embargo, hemos demostrado la capacidad de los corderos entre 2 y 4 meses de reconocer de forma específica el antígeno parcialmente aislado por nosotros, perteneciendo estos animales fundamentalmente a dos razas ovinas diferentes como son Churra y Manchega.

El reconocimiento detectado, sin embargo, resultó inferior al desarrollado por animales adultos pertenecientes a su misma o a diferente raza ovina. La explicación podría deberse a una capacidad inferior del sistema inmunitario, implicando varias poblaciones involucradas en la respuesta inmunitaria, tanto sistémica como local, que aparecieron en distinta proporción entre animales adultos y animales jóvenes (Watson y col., 1992; Douch, 1988).

Un logro importante en el diagnóstico de la hemoncosis ovina es la capacidad de detectar la infestación durante el periodo de prepatencia, evitando esperas innecesarias o bien detectando aquéllos vermes que permanecieron en hipobiosis, y que en un futuro podrían actuar como contaminantes del medio. De esta forma las

medidas para controlar la enfermedad podrían aplicarse lo más pronto posible. Además, el sistema diagnóstico podría emplearse en ensayos de protección, donde los vermes podrían no alcanzar por completo su desarrollo, así como la utilización en pruebas de resistencia a antihelmínticos. El antígeno caracterizado por nosotros fue reconocido de forma intensa durante el periodo de prepatencia de la enfermedad, como se demostró en este y en estudios anteriores (M. Cuquerella, tesis doctoral). Este hecho no ha sido demostrado en otras publicaciones que estudian antígenos de **H. contortus** con poder diagnóstico, donde el reconocimiento más temprano estudiado resultó a las tres semanas de infestación, es decir, al inicio de la patencia (Schallig y col., 1994b).

En ocasiones el reconocimiento fue superior durante el periodo de prepatencia que el detectado en infestaciones algo más avanzadas (4 semanas de infestación). Esto sucedió en las infestaciones experimentales realizadas en los animales jóvenes que se emplearon como donantes de material parasitario, así como en las infestaciones experimentales desarrolladas en algunas razas ovinas españolas. Este suceso podría deberse al acomplejamiento de los anticuerpos con el antígeno durante un periodo determinado de la hemoncosis, o bien a una presencia en sangre de proteínas sanguíneas disminuidas a causa de la enfermedad, incluyendo las inmunoglobulinas. Sin embargo, en un periodo posterior de la enfermedad, de nuevo aparece el reconocimiento del antígeno de 26 kDa con igual intensidad, pudiendo coincidir con una ligera recuperación de los valores hemáticos de proteínas.

En las infestaciones adquiridas de forma natural por los animales, la norma suelen ser las infestaciones mixtas, implicando varias especies parásitas, y en especial involucrando varias especies de nematodos, cuyo diagnóstico específico, ya sea de forma tradicional mediante detección de huevos y posterior coprocultivo, o bien mediante diagnósticos indirectos a partir de los anticuerpos producidos por el animal frente al material parasitario resulta complicado (Cuquerella y col., 1993; Schallig y col., 1994b, 1995).

En nuestro trabajo se tomaron muestras fecales y sanguíneas de forma puntual en distintas explotaciones ovinas cercanas a nuestras instalaciones, determinando en

cada caso las especies parásitas implicadas en las infecciones/infestaciones naturales. En la mayoría de los animales muestreados no se detectaron anticuerpos dirigidos hacia nuestro antígeno, a pesar de mostrar los animales cargas moderadas de tricostrongídeos (fundamentalmente de los géneros **Trichostrongylus** y **Teladorsagia**), así como de otros parásitos tales como protozoos, cestodos y trematodos, que aparecieron en pleno periodo prepatente. El reconocimiento del antígeno identificado por nosotros apareció únicamente en las dos explotaciones en que se evidenció presencia de **H. contortus** mediante coprocultivo de las muestras fecales. La aparición de infestaciones debidas a este nematodo resultó en periodo posterior a la presencia de lluvia en la Comunidad de Madrid, tras un periodo de considerable sequía. Es probable que por esta razón no se detectasen infestaciones por **H. contortus** en las explotaciones muestreadas con anterioridad. Dentro de estas explotaciones que mostraron presencia de hemoncosis los animales mostraron diferente capacidad de reconocimiento del antígeno, apareciendo la inmunodetección en un 62,5% positiva en la explotación denominada "El Espartal", mientras que lo hizo en 55% en la explotación denominada "El Molar". Esta razón explica que al enfrentar las mezclas séricas de los rebaños a nuestro antígeno, el reconocimiento resultase sólo evidente en la explotación de "El Espartal".

Por otra parte, hay que señalar que si bien el antígeno detectó infestaciones patentes por el nematodo estudiado, las hemoncosis prepatentes son también detectadas, incluso de forma más intensa, mediante las inmunoimprontas realizadas, al menos durante las infestaciones experimentales. Asimismo, durante las infestaciones naturales, se detectó un escaso número de animales con infestación patente, los cuales eliminaban un número reducido de huevos correspondientes a **H. contortus**, por lo que el antígeno resultó de gran sensibilidad. Hay que destacar, sin embargo, la necesidad de realizar muestreos en animales con infestaciones naturales adquiridas durante el pastoreo, pero implicando un número mayor de muestras que incluyan sacrificio de los animales con el fin de detectar de forma definitiva la presencia o ausencia de **H. contortus**, o bien, de forma alternativa, realizar seguimiento de las explotaciones y de los individuos, lo cual, desgraciadamente, resultó imposible en nuestro caso.

Por último, conviene destacar la capacidad del antígeno aislado por nosotros de diagnosticar la hemoncosis experimental en animales pertenecientes a diferentes razas ovinas españolas, Castellana, Churra, Merina y Manchega, además de comprobar su capacidad en otra raza ovina situada a gran distancia geográfica como es la raza Texel. Mientras que de los animales pertenecientes a esta última raza únicamente conocíamos la presencia (20 animales) o ausencia (10 animales) de infestación monoespecífica por **H. contortus**, los animales empleados por nosotros en el presente trabajo, y pertenecientes a cuatro razas ovinas, fueron capaces de desarrollar anticuerpos de forma específica frente al nuestro antígeno durante los periodos de prepatencia (dos semanas de infestación), patencia temprana (4 semanas de infestación) y patencia avanzada (6 semanas de infestación). Además el antígeno se reconoció a lo largo de toda la infestación en los animales primoinfestados, a pesar de que en los animales que recibieron doble infestación pertenecientes a las razas Churra y Merina el reconocimiento no resultó tan evidente. En los animales de raza Merina podría explicarse por la ausencia de vermes en el 50 % de los animales pertenecientes a su grupo experimental. Sin embargo, no existe una explicación similar en el grupo 2 de la raza Churra, aunque hay que señalar que lo mismo sucedió en los animales jóvenes empleados como donadores de material parasitario, pudiendo coincidir este periodo con un descenso notable en las proteínas séricas (Abbott y col., 1986; Vray y col., 1988; Rahman y Collins, 1990b).

Por otra parte hay que señalar que los animales que fueron muestreados, y en los que se comprobó la validez diagnóstica del antígeno aislado por nosotros, pertenecían en su mayoría a una raza local denominada Rubia del Molar, mientras que otro grupo de animales de raza Segureña, que fueron traídos de Murcia, no mostraron ni infestaciones por **H. contortus** ni detección del antígeno de 26 kDa. Asimismo, es necesario destacar que las infestaciones naturales adquiridas por estos animales implicaron una estirpe parasitaria diferente a la empleada por nosotros tanto en las infestaciones experimentales como en el material antigénico utilizado en los estudios de caracterización e inmunológicos. El empleo de diferentes estirpes parasitarias en diversos estudios inmunológicos ha resultado en ocasiones en ligeras diferencias en la calidad de los productos obtenidos.

CONCLUSIONES

1ª Los animales adultos pertenecientes a las 4 razas ovinas autóctonas españolas Castellana, Churra, Merina y Manchega son capaces de responder de forma adecuada a la hemoncosis ovina experimental tras recibir una dosis parasitaria inicial, si bien con diferente intensidad.

2ª Los animales pertenecientes a las razas Castellana y Churra mostraron una mejor respuesta anti-**Haemonchus** en las reinfestaciones con reducciones importantes en el número de vermes y porcentaje de implantación, mientras que los pertenecientes a las razas Merina y Manchega se mostraron más resistentes de forma natural a la implantación de **Haemonchus contortus**.

3ª En la raza Manchega apareció una mayor tendencia a la inhibición del desarrollo parasitario asociada a una respuesta inmunitaria, hallándose mayores números de larvas de cuarto estadio en la mucosa del abomaso, así como menores medidas en los vermes adultos encontrados en los animales que recibieron dos infestaciones.

4ª Las infestaciones provocaron una respuesta IgG sérica, fundamentalmente IgG1, en todos los animales. En la raza Castellana se observó una típica respuesta secundaria. Las respuestas IgG e IgA séricas fueron dosis dependientes.

5ª Se ha comprobado la validez diagnóstica interracial del antígeno de 26 kDa aislado a partir de vermes adultos de **H. contortus**. El antígeno resultó de utilidad diagnóstica en las razas españolas Castellana, Churra, Merina, Manchega, Rubia del Molar así como en la raza Texel.

6ª Se ha comprobado la capacidad del antígeno de 26 kDa de diagnosticar infestaciones naturales desde el periodo prepatente de la enfermedad y en todas las edades.

7ª Se ha realizado una caracterización, aislamiento y secuenciación parcial del antígeno de 26 kDa de adultos de **H. contortus** correspondiendo a la secuencia N-terminal NH2- A G L F A H H P P P.

8ª Se ha aislado y secuenciado una Glutation-S-transferasa procedente de vermes adultos de **H. contortus** correspondiendo a la secuencia N-terminal NH2- V N Y K L T Y F.

Abbott, E.M.; Parkins, J.J. y Holmes, P.H. (1985). Influence of dietary protein on parasite establishment and pathogenesis in Finn Dorset and Scottish Blackface lambs given a single moderate infection on **Haemonchus contortus**. Research in Veterinary Science, 38: 6-13.

Abbott, E.M.; Parkins, J.J. y Holmes, P.H. (1986). The effect of dietary protein on the pathophysiology of acute ovine haemonchosis. Veterinary Parasitology, 20: 291-306.

Abbott, E.M. y Holmes, P.H. (1990). Influence of dietary protein on the immune responsiveness of sheep to **Haemonchus contortus**. Research in Veterinary Science, 48: 103-107.

Adams, D.B. (1983). Observations on the self-cure reaction and other forms of immunological responsiveness against **Haemonchus contortus** in sheep. International Journal for Parasitology, 13 (6): 571-578.

Adams, D.B. (1986). Developmental arrest of **Haemonchus contortus** in sheep treated with a corticosteroid. International Journal for Parasitology, 16 (6): 659-664.

Adams, D.B. (1988a). The effect of dexamethasone on a single and a superimposed infection with **Haemonchus contortus** in sheep. International Journal for Parasitology, 18 (5): 575-579.

Adams, D.B. (1988b). Infection with **Haemonchus contortus** in sheep and the role of adaptive immunity in selection of the parasite. International Journal for Parasitology, 18: 1071-1075.

Adams, D.B. (1989). A preliminary evaluation of factors affecting an experimental system for vaccination-and-challenge with **Haemonchus contortus** in sheep. International Journal for Parasitology, 19 (2): 169-175.

Adams, D.B. (1990). Infection of immunosuppressed mice with the abomasal nematode parasite of ruminants **Haemonchus contortus**. International Journal for Parasitology, 20: 631-636.

Adams, D.B. (1993). Systemic responses to challenge infection with **Haemonchus contortus** in immune Merino sheep. Veterinary Research Communications, 17: 25-35.

Adams, D.B. y Beh, K.J. (1981). Immunity acquired by sheep from an experimental infection with **Haemonchus contortus**. International Journal for Parasitology, 11 (5): 381-386.

Adams, D.B. y Colditz, J.G. (1991). Immunity to **Haemonchus contortus** and the cellular response to helminth antigens in the mammary gland of non-lactating sheep. International Journal for Parasitology, 21 (6): 631-639.

Adams, D.B.; Anderson, B.H. y Windon, R.G. (1989). Cross-immunity between **Haemonchus contortus** and **Trichostrongylus colubriformis** in sheep. International Journal for Parasitology, 19 (7): 717-722.

Adams, D.B.; Lynch, J.J.; Anderson, B.H.; Fell, L.R.; Hinch, G.N. y Munro, R.K. (1990). The intensity of resistance by mature Merino ewes against **Haemonchus contortus** and **Trichostrongylus colubriformis** in single-species and combined-species infection. Australian Veterinary Journal, 67 (12): 443-445.

Albers, G.A.A. y Burgess, S.K. (1988). Serial passage of **Haemonchus contortus** in resistant and susceptible sheep. Veterinary Parasitology, 28: 303-306.

Albers, G.A.A.; Gray, G.D.; Piper, L.R.; Barker, J.S.F.; Le jambre, L.F. y Barger, I.A. (1987). The genetics of resistance and resilience to **Haemonchus contortus** infection in young Merino sheep. International Journal for Parasitology, 17 (3): 1355-1363.

Allonby, E.W. y Urquhart, G.M. (1976). A possible relationship between haemonchosis and haemoglobin polymorphism in Merino sheep in Kenya. Research in Veterinary Science, 20: 212-214.

- Altaif, K.I. y Dargie, J.D. (1978a). Genetic resistance to helminths. The influence of breed and haemoglobin type on the response of sheep to primary infections with **Haemonchus contortus**. Parasitology, 77: 161-175.
- Altaif, K.I. y Dargie, J.D. (1978b). Genetic resistance to helminths. The influence of breed and haemoglobin type on the response of sheep to re-infection with **Haemonchus contortus**. Parasitology, 77: 177-187.
- Anderson, D.V.; Dixon, S.C.; Graham, R.B.; Smith, W.D. y Tucker, E. (1989). Ovine monoclonal antibody to **Ostertagia circumcincta**. Biochemical Society Transactions, 17: 736.
- Andrews, S.J.; Hole, N.J.K.; Munn, E.A. y Rolph, T.P. (1995). Vaccination of sheep against haemonchosis with H11, a gut membrane-derived protective antigen from the adult parasite: prevention of the periparturient rise and colostral transfer of protective immunity. International Journal for Parasitology, 25 (7): 839-846.
- Ashman, K; Mather, J.; Wiltshire, C.; Jacobs, H.J. y Meeusen, E. (1995). Isolation of a larval surface glycoprotein from **Haemonchus contortus** and its possible role in evading host immunity. Molecular and Biochemical Parasitology, 70: 175-179.
- Barger, I.A. (1984). Correlations between numbers of enteric nematode parasites in grazing lambs. International Journal for Parasitology, 14 (6): 587-589.
- Barger, I.A. (1985). The statistical distribution of trichostrongylid nematodes in grazing lambs. International Journal for Parasitology, 15 (6): 645-649.
- Barger, I.A. (1988). Resistance of young lambs to **Haemonchus contortus** infection, and its loss following anthelmintic treatment. International Journal for Parasitology, 18 (8): 1107-1109.
- Barger, I.A. (1989). Genetic resistance of hosts and its influence on epidemiology. Veterinary Parasitology, 32: 21-35.
- Barger, I.A. (1993). Influence of sex and reproductive status on susceptibility of ruminants to nematode parasitism. International Journal for Parasitology, 23 (4): 463-469.
- Barger, I.A.; Le Jambre, L.F.; Georgi, J.R. y Davies, H.I. (1985). Regulation of **Haemonchus contortus** populations in sheep exposed to continuous infection. International Journal for Parasitology, 15 (5): 529-533.
- Barnes, E.H. y Dobson, R.J. (1993). Persistence of acquired immunity to **Trichostrongylus colubriformis** in sheep after termination of infection. International Journal for Parasitology, 23 (8): 1019-1026.
- Bautista-Garfias, C.R.; Flores- Hernández y Quiroz-Romero, H. (1991). Non-specific resistance of sheep against **Haemonchus contortus** with Freund's complete adjuvant. Parasite Immunology, 13: 565-569.
- Bendixsen, T.; Emery, D.L. y Jones, W.O. (1995). The sensitization of mucosal mast cells during infections with **Trichostrongylus colubriformis** or **Haemonchus contortus** in sheep. International Journal for Parasitology, 25 (6): 741-748.
- Berezhko, V.K.; Akulin, N.A.; Buzmakova, R.A. y Kurochkina, K.G. (1987). Immunoallergic reactions and a phenomenon of self-cure in experimental haemonchosis (**Haemonchus contortus**) of sheep depending on host's age, Helminthologia, 24: 119-131.
- Blanchard, J.L. y Wescott, R.B. (1985). Enhancement of resistance of lambs to **Haemonchus contortus** by previous infection with **Ostertagia circumcincta**. American Journal of Veterinary Research, 46 (10): 2136-2140.
- Blood, D.C. y Radostits, O.M. (1989). Veterinary Medicine. Baillière Tindall, London. pp.1018-1019, 1056-1060.

Boisvenue, R.J.; Stiff, M.I.; Tonkinson, L.V. y Cox, G.N. (1991). Protective studies in sheep immunized with cuticular collagen proteins and peptides of **Haemonchus contortus**. Parasite Immunology, 13: 227-240.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annales of Biochemistry, 72: 248-254.

Brophy, P.M. y Pritchard, D.I. (1992). Immunity to helminths: ready to tip the biochemical balance. Parasitology Today, 8 (12): 419-422.

Byszewska-Spocinska, E y Stankiewicz, M. (1985). Immunological studies on experimental hemoncosis in sheep. IV. Multiple infections of Polish long-wool sheep. Acta Parasitologica Polonica, 30 (11): 95-108.

Canals Caballero, A. (1986). Estudios epidemiológicos de la gastroenteritis parasitaria ovina: factores que modifican los niveles de pepsinógeno. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

Charley-Poulain, J; Luffau, G. y Péry, P. (1984). Serum and abomasal antibody response of sheep to infections with **Haemonchus contortus**. Veterinary Parasitology, 14: 129-141.

Christensen, C.M.; Zarlenga, D.S. y Gasbarre, L.C. (1994). **Ostertagia, Haemonchus, Cooperia**, and **Oesophagostomum**: construction and characterization of genus-specific DNA probes to differentiate important parasites of cattle. Experimental Parasitology, 78: 93-100.

Christie, M.G.; Hart, R.; Angus, K.W.; Devoy, J. y Patterson, J.E. (1978). Resistance to **Haemonchus contortus** in sheep given repeated daily doses of 10000 infective larvae. Journal of Comparative Pathology, 88: 157-165.

Clarke, M.W. y Slocombe, J.O.D. (1984). Partial biochemical and serological characterization of exsheathing fluid and somatic extracts of infective larvae and adult females of **Haemonchus contortus**. Canadian Journal of Comparative Pathology, 48: 166-170.

Coadwell, W.J. y Ward, P.F.V. (1975). Observations on the development of **Haemonchus contortus** in young sheep given a single infection. Parasitology, 71: 505-515.

Cobon, D.H. y O'Sullivan, B.M. (1992). Effect of **Haemonchus contortus** on productivity of ewes, lambs and weaners in a semi-arid environment. Journal of Agricultural Science, 118: 245-248.

Coop, R.L.; Mellor, D.J.; Jackson, E.; Jackson, F.; Flint, D.J. y Vernon, R.G. (1990). **Teladorsagia circumcincta** egg output at the onset of natural and induced lactation in ewes. Veterinary Parasitology, 35: 295-305.

Cooper, D.W., van Oorschoot, R.A.H.; Piper, L.R. y Le Jambre, L.F. (1989). No association between the ovine leucocyte antigen (OLA) system in the Australian Merino and susceptibility to **Haemonchus contortus** infection. International Journal for Parasitology, 19 (6): 695-697.

Cordero del Campillo, M.; Castañón Ordoñez, L. y Reguera Feo, A. (1994). In: García, S. (Edit.). Índice-catálogo de zooparásitos ibéricos (2ª edición). Universidad de León, Secretariado de Publicaciones.

Courtney, C.H.; Parker, C.F.; McClure, K.E. y Herd, R.P. (1985a). Resistance of exotic and domestic lambs to experimental infections with **Haemonchus contortus**. International Journal for Parasitology, 15 (1): 101-109.

Courtney, C.H.; Parker, C.F.; McClure, K.E. y Herd, R.P. (1985b). Resistance of nonlambing exotic and domestic ewes to naturally acquired gastrointestinal nematodes. International Journal for Parasitology, 15 (3): 239-243.

Courtney, C.H.; Gessner, R.; Sholz, S.R. y Loggins, P.E. (1986). The periparturient rise in fecal egg counts in three strains of Florida native ewes and its value in predicting resistance of lambs to **Haemonchus contortus**. International Journal for Parasitology, 16 (3): 185-189.

Cox, G.N. (1992). Molecular and biochemical aspects of nematode collagens. The Journal of Parasitology, 78 (1): 1-15.

Cox, F.E.G. y Liew, E.Y. (1992). T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. Parasitology Today, 8 (11): 371-374.

Cox, G.N.; Shamansky, L.M. y Boisvenue, R.J. (1989). Identification and preliminary characterization of cuticular surface proteins of **Haemonchus contortus**. Molecular and Biochemical Parasitology, 36: 233-242.

Cox, G.N.; Shamansky, L.M. y Boisvenue, R.J. (1990a). **Haemonchus contortus**: evidence that the 3A3 collagen gene is a member of an evolutionary conserved family of nematode cuticle collagens. Experimental Parasitology, 70: 175-185. (Diagnóstico)

Cox, G.N.; Shamansky, L.M. y Boisvenue, R.J. (1990b). **Haemonchus contortus**: a simple procedure for purifying surface proteins from third- and fourth-stage larvae. Experimental Parasitology, 70: 227-235.

Coyne, M.J.; Smith, G. y Johnstone, C. (1991a). Fecundity of gastrointestinal trichostrongylid nematodes of sheep in the field. American Journal of Veterinary Research, 52: 1182-1188.

Coyne, M.J.; Smith, G. y Johnstone, C. (1991b). A study of the mortality and fecundity of **Haemonchus contortus** in sheep following experimental infections. International Journal for Parasitology, 21: 847-853.

Coyne, M.J. y Smith, G. (1992). The mortality and fecundity of **Haemonchus contortus** in parasite-naïve and parasite-exposed sheep following single experimental infections. International Journal for Parasitology, 22 (3): 315-325.

Cuquerella Ayensa, M. (1992). Respuesta humoral en la hemoncosis ovina. Dinámica de la producción de anticuerpos y caracterización antigénica de **Haemonchus contortus**. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Cuquerella, M.; Gómez-Muñoz, M.T. y Alunda, J.M. (1991). Serum IgG of Manchego lambs to infections with **Haemonchus contortus** and preliminary characterizations of adult antigens. Veterinary Parasitology, 38: 131-143.

Cuquerella, M. Gómez-Muñoz, M.T. de la Fuente, C; Carrera, L. y Alunda, J.M. (1993). Lamb serum recognition of infective larvae and adult **Haemonchus contortus** antigens. Veterinary Parasitology, 49: 255-264.

Cuquerella, M.; Gómez-Muñoz, M.T.; Carrera, L.; de la Fuente, C. y Alunda, J.M. (1994a). Cross antigenicity among ovine trichostrongyloidea. Preliminary report. Veterinary Parasitology, 53: 243-251.

Cuquerella, M.; Gómez-Muñoz, M.T.; Méndez, S. y Alunda, J.M. (1994b). Partial protection of manchego sheep against **Haemonchus contortus** after a 6-month postpriming period. Preliminary note. Journal of Veterinary Medicine, B, 41: 399-406.

Dash, K.M. (1985). Distribution of trichostrongylid nematodes in the abomasum of sheep. International Journal for Parasitology, 15 (5): 505-510.

Dargie, J.M. y Allonby, E.W. (1975). Pathophysiology of single and challenge infection of **Haemonchus contortus** in Merino sheep: studies on red cell kinetics and the "self cure" phenomenon. International Journal for Parasitology, 5: 147-157.

Díez-Baños, N.; Cabaret, J. y Díez-Baños, P. (1992). Interspecific interactions in naturally acquired nematode communities from sheep abomasum in relation to age of host and season in four areas of León (Spain). International Journal for Parasitology, 22 (3): 327-334.

Díez Baños, N.; Díez Baños, P y Cordero del Campillo, M. (1989). Infestación natural por nematodos del abomaso de ovinos, en la provincia de León (España). Facta VI Congreso Nacional de Parasitología, Cáceres: p. 133.

Dineen, J.K.; Gregg, P. y Lascelles, A.K. (1978). The response of lambs to vaccination at weaning with irradiated **Trichostrongylus colubriformis** larvae: segregation into "responders" and "non-responders". International Journal for Parasitology, 8: 59-63.

Dobson, R.J. y Barnes, E.H. (1995). Interaction between **Ostertagia circumcincta** and **Haemonchus contortus** infection in young lambs. International Journal for Parasitology, 25 (4): 495-501.

Dopheide, T.A.A.; Tachedjian, M.; Phillips, C.; Frenkel, M.J.; Wagland, B.M. y Ward, C.W. (1991). Molecular characterisation of a protective 11 kDa excretory-secretory protein from the parasitic stages of **Trichostrongylus colubriformis**. Molecular and Biochemical Parasitology, 45: 101-108.

Douch, P.G.C. (1988). The response of young Romney lambs to immunization with **Trichostrongylus colubriformis** larvae. International Journal for Parasitology, 18 (8): 1035-1038.

Douch, P.G.C. y Morum, P.E. (1993). The effect of age on the response of Romney sheep to gastrointestinal nematodes during grazing. International Journal for Parasitology, 23 (5): 651-655.

Douch, P.G.C.; Harrison, G.B.L.; Buchanan, L.L. y Brunndon, R.V. (1984). Relationship of histamine in tissues and antiparasitic substances in gastrointestinal mucus to the development of resistance to trichostrongyle infections in young sheep. Veterinary Parasitology, 16: 273-288.

Douch, P.G.C.; Harrison, G.B.L.; Elliot, D.C.; Buchanan, L.L. y Greer, K.S. (1986). Relationship of gastrointestinal histology and mucus antiparasite activity with the development of resistance to trichostrongyle infections in sheep. Veterinary Parasitology, 20: 315-331.

Douch, P.G.C.; Harrison, G.B.L.; Buchanan, L.L. y Greer, K.S. (1988). Relationship of nematode cholinesterase activity and nematode burdens to the development of resistance to trichostrongyle infections in sheep. Veterinary Parasitology, 27: 291-308.

Douch, P.G.C.; Green, R.S.; Morris, C.A. y Hickey, S.M. (1995). Genetic factors affecting antibody responses to four species of nematode parasite in Romney ewe lambs. International Journal for Parasitology, 25 (7): 823-828.

Duncan, J.L.; Smith, W.D. y Dargie, J.D. (1978). Possible relationship of levels of mucosal IgA and serum IgG to unresponsiveness of lambs to **Haemonchus contortus**. Veterinary Parasitology, 4: 21-27.

Ellis, T.M.; Gregory, A.; Turnor, R.; Kalkhoven, M. y Wroth, R.H. (1993). Detection of **Haemonchus contortus** surface antigen in faeces from infected sheep. Veterinary Parasitology, 51: 85-97.

Emery, D.L.; Wagland, B.M. y McClure, S.J. (1993). Rejection of heterologous nematodes by sheep immunized with larval or adult **Trichostrongylus colubriformis**. International Journal for Parasitology, 23 (7): 841-846.

Emery, D.L.; McClure, S.J. y Wagland, B.M. (1993). Production of vaccines against gastrointestinal nematodes of livestock. Immunology and Cell Biology, 71: 463-472.

Emery, D.L. y McClure, S.J. (1995). Studies on the inhibition of rejection of **Trichostrongylus colubriformis** larvae from immune sheep. International Journal for Parasitology, 25 (6): 761-764.

Fernández Díez, M. (1967). Epizootiología de las infestaciones por Trichostrongylidae en los ovinos de León. Anales de la Facultad de Veterinaria de León, 13: 53-109.

Fleming, M.W. (1988). Size of inoculum dose regulates in part worm burdens, fecundity and lengths in ovine **Haemonchus contortus** infections. Journal of Parasitology, 74: 975-978.

Fleming, M.W. y Conrad, S.D. (1989). Effects of exogenous progesterone and/or prolactin on **Haemonchus contortus** infections in ovariectomized ewes. Veterinary Parasitology, 34: 57-62.

Fox, M.T.; Jacobs, D.E. y Sani, R.A. (1991). Blood gastrin and pepsinogen responses of native village goats in Malaysia to infection with **Haemonchus contortus**. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 85 (2): 263-267.

de la Fuente, C.; Cuquerella, M.; Carrera, L. y Alunda, J.M. (1993). Effect of subclinical coccidiosis in kids on subsequent trichostrongylid infection after weaning. Veterinary Parasitology, 53: 243-251.

Gamble, H.R. y Zajac, A.M. (1992). Resistance of St. Croix lambs to **Haemonchus contortus** in experimentally and naturally acquired infections. Veterinary Parasitology, 41: 211-225.

García Romero, C.; Valcárcel-Sancho, F.; Cordero del Campilo, M. y Rojo-Vázquez, F.A. (1993). Etiología y epizootiología de las infestaciones por tricostrongílidos ovinos en la comarca de Oropesa (Toledo). Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animal, 8 (2): 155-168.

Gasbarre, L.C.; Eldin, A.L. y Davies, C.J. (1990). Genetic control of immunity to gastrointestinal nematodes of cattle. Veterinary Parasitology, 37: 257-272.

Georgi, J.R. y Georgi, E.G. (1990). In: Dyson, Kilmer y Dick (Edits.). Parasitology for veterinarians (fifth edition). W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Gibbons, L.M. y Khalil, L.F. (1982). A key for the identification of genera of the nematode family Trichostrongylidae Leiper, 1912. Journal of Helminthology, 56: 185-233.

Gill, H.S. (1991). Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. Parasite Immunology, 13: 617-628.

Gill, H.S. (1994). Antibody-containing cells in the abomasal mucosa of sheep with genetic resistance to **Haemonchus contortus**. Research in Veterinary Science, 56: 41-47.

Gill, H.S. y Altman, K.G. (1995). IFN- γ production during **Haemonchus contortus** infection in sheep. Fourth International Veterinary immunology Symposium. Julio, 1995. University of California, Davies. p. 146.

Gill, H.S.; Gray, G.D. y Watson, D.L. (1991a). Mechanism underlying genetic resistance to **Haemonchus contortus** in sheep. In: Gray, G.D. y Woolaston, R.R. (Edits.). Breeding for disease resistance in sheep. Australian Wool Corporation, Melbourne, pp. 67-75.

Gill, H.S.; Pomroy, W.E.; Charleston, W.A.G. y Moriarty, K.M. (1991b). Caprine haemonchosis: lymphocyte responses to parasite antigen and mitogen. Small Ruminant Research, 4: 101-108.

Gill, H.S.; Gray, G.D.; Watson, D.L. y Husband, A.J. (1993a). Isotype-specific antibody responses to **Haemonchus contortus** in genetically resistant sheep. Parasite Immunology, 15: 61-67.

Gill, H.S.; Watson, D.L. y Brandon, M.R. (1993b). Monoclonal antibody to CD4⁺ T cells abrogates genetic resistance to **Haemonchus contortus** in sheep. Immunology, 78: 43-49.

Gómez García, J.A. y Blázquez Merino, M.I. (1994). Epidemiología de la gastroenteritis parasitaria ovina en pastoreo de cereales de invierno en Albacete. XVIII jornadas de la sociedad española de ovinotecnia y caprinotecnia. Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha. pp293-298.

Gray, G.D. y Gill, H.S. (1993). Host genes, parasites and parasitic infections. International Journal for Parasitology, 23 (4): 485-494.

- Gruner, L. (1991). Breeding for helminth resistance in sheep and goats. In: (Owen, J.B. y Axford, R.F.E. (Edits.). Breeding for disease resistance in farm animals. C.A.B. international, U.K., pp. 187-200.
- Gruner, L. y Cabaret, J. (1988). Resistance of sheep and goats to helminth infections: a genetic basis. In: Thomson, E.F. y Thomson, F.S. (Edits.). Increasing small ruminant productivity in semi-arid areas. ICARDA, Holanda, pp. 258-265.
- Gruner, L.; Bouix, J.; Cabaret, J.; Boulard, C.; Cortet, J.; Sauve, C.; Molenat, G. y Calames, M. (1992). Effect of genetic type, lactation and managements on helminth infection of ewes in an intensive grazing system on irrigated pasture. International Journal for Parasitology, 22 (7): 919-925.
- Habig, W.H.; Pabst, M.J. y Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. The Journal of Biological Chemistry, 249 (22): 7130-7139.
- Haig, D.M.; Windon, R.; Blackie, W.; Brown, D. y Smith, W.D. (1989). Parasite-specific T cell responses of sheep following live infection with the gastric nematode **Haemonchus contortus**. Parasite Immunology, 11: 463-477.
- Hendrikx, W.M.L. (1990). De nematode **Haemonchus contortus**: antigeenkarakter en immuunrespons bij konijnen en schapen. Tijdschrift Diergeneeskunde, 115: 1092-1101.
- Hohenhaus, M.A. y Outteridge, P.M. (1995). The immunogenetics of resistance to **Trichostrongylus colubriformis** and **Haemonchus contortus** parasites in sheep. British Veterinary Journal, 151: 119.
- Holmes, P.H. (1986). Pathophysiology of nematode infections. In: Howell, M.J. (Edit.). Parasitology, Quo Vadit?. Australian Academy of Science, Canberra. pp. 443-451.
- Honde, C.; Chayvialle, J.A.; Cuber, J.C. y Bueno, L. (1985). Early changes in plasma pancreatic polypeptide, somatostatin, gastrin and motilin levels induced by **H. contortus** infection in lamb. Annales de Recherches Vétérinaires, 16 (3): 195-200.
- Hoste, H. y Chartier, C. (1993). Comparison of the effects on milk production of concurrent infection with **Haemonchus contortus** and **Trichostrongylus colubriformis** in high- and low-producing dairy goats. American Journal of Veterinary Research, 54 (11): 1886-1893.
- Hunter, A.R. y McKenzie, G. (1982). The pathogenesis of a single challenge dose of **Haemonchus contortus** in lambs under six months of age. Journal of Helminthology, 56: 135-144.
- Hunter, A.R.; Mackenzie, G. y Ross, J.G. (1983). The effects of transfer factor, parasitic antigen and precipitated immunoglobulin treatments in lambs infected with **Haemonchus contortus**. Veterinary Parasitology, 13: 45-53.
- Huntley, J.F.; Gibson, S.; Brown, D.; Smith, W.D.; Jackson, F. y Miller, H.R.P. (1987). Systemic release of a mast cell proteinase following nematode infections in sheep. Parasite Immunology, 9: 603-614.
- Huntley, J.F.; Newlands, G.F.J.; Jackson, F. y Miller, H.R.P. (1992). The influence of challenge dose, duration of immunity, or steroid treatment on mucosal mast cells and on the distribution of sheep mast cell proteinase in **Haemonchus**- infected sheep. Parasite Immunology, 14: 429-440.
- Jasmer, D.G. y McGuire, T.C. (1991). Protective immunity to a blood-feeding nematode (**Haemonchus contortus**) induced by parasite gut antigens. Infection and Immunity, 59 (12): 4412-4417.
- Jeffcoate, I.A.; Fishwick, G.; Bairden, K.; Armour, J. y Holmes, P.H. (1990). Pathophysiology of the periparturient egg rise in sheep: the role of prolactin. Research in Veterinary Science, 48: 295-300.
- Jeffcoate, I.A.; Wedrychowicz, H.; Fishwick, G.; Dunlop, E.M.; Duncan, J.L. y Holmes, P.H. (1992). Pathophysiology of the periparturient egg rise in sheep: a possible role for IgA. Research in Veterinary Science, 53: 212-218.

- Jelinek, P.D.; Ellis, T.; Wroth, R.H.; Sutherland, S.S.; Masters, H.G. y Petterson, D.S. (1988). The effect of selenium supplementation on immunity, and the establishment of an experimental **Haemonchus contortus** infection, in weaner Merino sheep fed a low selenium diet. Australian Veterinary Journal, 65: 214-217.
- Jones, W.O. y Emery, D.L. (1991). Demonstration of a range of inflammatory mediators released in trichostrongylosis of sheep. International Journal for Parasitology, 21 (3): 361-363.
- Jones, W.O.; Windon, R.G.; Steel, J.W. y Outteridge, P.M. (1990). Histamine and leukotriene concentrations in duodenal tissue and mucus of lambs selected for high and low responsiveness to vaccination and challenge with **Trichostrongylus colubriformis**. International Journal for Parasitology, 20 (8): 1075-1079.
- Jones, W.O.; Huntley, J.F. y Emery, D.L. (1992). Isolation and degranulation of mucosal mast cells from the small intestine of parasitized sheep. International Journal for Parasitology, 22 (4): 519-521.
- Jones, W.O.; Emery, D.L.; McClure, S.J. y Wagland, B.M. (1994). Changes in inflammatory mediators and larval inhibitory activity in intestinal contents and mucus during primary and challenge infections of sheep with **Trichostrongylus colubriformis**. International Journal for Parasitology, 24 (4): 519-525.
- Karanu, F.N.; Rurangirwa, F.R.; McGuire, T.C. y Jasmer, D.P. (1993). **Haemonchus contortus**: identification of proteases with diverse characteristics in adult worm excretory-secretory products. Experimental Parasitology, 77: 362-371.
- Kassai, T. y Sréter, T. (1992). Genetic aspects of host resistance to helminth infections. Research and Reviews in Parasitology, 52 (3-4): 67-75.
- Kassai, T.; Fésüs, L.; Hendriks, W.M.L.; Takáts, Cs.; Fok, E.; Redl, P.; Takács, E.; Nilsson, Ph.R.; van Leeuwen, M.A.W.; Jansen, J.; Bernadina, W.E. y Frankena, K. (1990). Is there a relationship between haemoglobin genotype and the innate resistance to experimental **Haemonchus contortus** infection in Merino lambs. Veterinary Parasitology, 37: 61-77.
- Kaufmann, J.; Dwinger, R.H.; Hallebeek, A.; van Dijk, B. y Pfister, K. (1992). The interaction of **Trypanosoma congolense** and **Haemonchus contortus** infections in trypanotolerant N'Dama cattle. Veterinary Parasitology, 43: 157-170.
- Klesius, P.H.; Washburn, S.M.; Ciordia, H. y Haynes, T.B. (1984). Lymphocyte reactivity to **Ostertagia ostertagi** L3 antigen in type 1 ostertagiosis. American Journal of Veterinary Research, 45: 230-233.
- Kloosterman, A.; Parmentier, H.K. y Ploeger, H.W. (1992). Breeding cattle and sheep for resistance to gastrointestinal nematodes. Parasitology Today, 8 (10): 330-335.
- Knox, D.P. y Jones, D.G. (1991). Parasite enzymes in the diagnostic and control of ruminant nematodiasis. In: Kenedy, M.W. (Edit.). Parasitic nematodes-antigens, membranes and genes. Editorial Taylor & Francis, London, New York, Philadelphia. pp. 170-194.
- Knox, D.P. y Jones, D.G. (1992). A comparison of superoxide dismutase (SOD, EC:1.15.1.1.) distribution in gastro-intestinal nematodes. International Journal for Parasitology, 22 (2): 209-214.
- Knox, D.P.; Redmond, D.L. y Jones, D.G. (1993). Characterization of proteinases in extracts of adult **Haemonchus contortus**, the ovine abomasal nematode. Parasitology, 106: 395-404.
- Kooyman, F.N.J. y Eysker, M. (1995). Analysis of proteins related to conditioning for arrested development and differentiation in **Haemonchus contortus** by two-dimensional gel electrophoresis. International Journal for Parasitology, 25: 561-568.
- Larsen, M.; Wolstrup, J.; Henriksen, S.A.; Dackman, C.; Grønvold, J. y Nansen, P. (1991). In vitro stress selection of nematophagous fungi for biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. Journal of Helminthology, 65: 193-200.

Lascelles, A.K.; Beh, K.J.; Mukkur, T.K. y Watson, D.L. (1986). The mucosal immune system with particular reference to ruminant animal. In: Morrison, W.I. (Edit.). The ruminant immune system in health and disease. Cambridge, University Press. pp: 429-457.

van Leeuwen, M.A.W.; Bernadina, W.E. y Hendriks, W.M.L. (1992). Humoral responses in rabbits immunized with two fractions of **Haemonchus contortus**: the antigen specificity of such antibodies. Veterinary Parasitology, 44: 199-209.

Lightowers, M.W. Y Rickard, M.D. (1988). Excretory-secretory products of helminths parasites: effects on host immune responses. Parasitology, 96: S123-S166.

López, V. y Urquhart, G.M. (1967). The immune response of Merino sheep to **Haemonchus contortus** infection. 3rd. International conferences of the World Association for the Advance of Veterinary Parasitology, Lyon. V.G. Elbert, Marburg-Lahn, pp. 153-159.

Luffau, G.; Péry, P. y Charley, J. (1981). Réponse immunitaire chez les ovins infestés expérimentalement par **Haemonchus contortus**: étude comparative chez le mâle et chez la femelle. Annales de Recherche Vétérinaire, 12 (2): 173-181.

Luffau, G.; Vu Tien Khang, J.; Bouix, J.; Nguyen, T.C.; Cullen, P. y Ricordeau, G. (1990). Resistance to experimental infections with **Haemonchus contortus** in Romanov sheep. Genetics, Selection and Evolution, 22: 205-229.

MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food). (1971). Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. HMSO, London.

Manton, V.J.A.; Peacock, R.; Poynter, D.; Silverman, P.H. y Terry, R.J. (1962). The influence of age on naturally acquired resistance to **Haemonchus contortus** in lambs. Research in Veterinary Science, 3: 308-314.

M.A.P.A.. Boletín mensual de estadística, 11-Noviembre-1995: 55-65.

Martínez Gómez, F. (1985). Problemas parasitarios de los rumiantes en régimen extensivo en el valle del Guadalquivir. Comunicaciones INIA, Serie: Higiene y Sanidad Animal, 11: 93-105.

McClure, S.J.; Emery, D.L.; Wagland, B.M. y Jones, W.O (1992). A serial study of rejection of **Trichostrongylus colubriformis** by immune sheep. International Journal for Parasitology, 22 (2): 227-234.

McClure, S.J.; Davey, S.J.; Emery, D.L. y Lloyd, J.B. (1995). In vivo depletion of T-cells subsets (CD8+ or TCR $\gamma\delta$ +) or of interferon- γ during primary exposure to an enteric parasite (**Trichostrongylus colubriformis**) enhances protective immunity. Fourth International Veterinary immunology Symposium. Julio, 1995. University of California, Davies. p. 51.

Mc Donald, J.W.; Overend, D.J. y Paynter, D.I. (1989). Influence of selenium status in merino weaners on resistance to trichostrongylid infection. Research in Veterinary Science, 47: 319-322.

McGillivray, D.J.; Yong, W.K.; Riffkin, G.G. y Adler, B. (1989). Extraction and identification of a 31,000 mol. wt. glycoprotein antigen of **Ostertagia circumcincta** by sera from resistant sheep. International Journal for Parasitology, 19: 473-478.

Mendoza-De Gives, P. y Vázquez-Prats, V.M. (1994). Reduction of **Haemonchus contortus** infective larvae by three nematophagous fungi in sheep faecal cultures. Veterinary Parasitology, 55: 197-203.

Michel, J.F. (1974). Arrested development of nematodes and some related phenomena. Advances in Parasitology, 12: 279-366.

Miller, H.R.P. (1984). The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. Veterinary Immunology and Immunopathology, 6: 167-259.

- Miller, H.R.P. (1986). Vaccination against intestinal parasites. In : Howell, M.J. (Edit.), Parasitology: Quo Vadit?, Australian Academy of Science, Canberra. pp. 43-51.
- Miller, H.R.P.; Jackson, F.; Newlands, G. y Appleyard, W.T. (1983). Immune exclusion, a mechanism of protection against the ovine nematode **Haemonchus contortus**. Research in Veterinary Science, 35: 357-363.
- Mostofa, M.; Mackellar, Q.A.; Eckersall, P.D. y Gray, D. (1990). Pepsinogen types in worm-free sheep and in sheep infected with **Ostertagia circumcincta** and **Haemonchus contortus**. Research in Veterinary Sciences, 48: 108-111.
- Mulligan, W.; Gordon, H.McL; Stewart, D.F. y Wagland, B.M. (1961). The use of irradiated larvae as immunizing agents in **Haemonchus contortus** and **Trichostrongylus colubriformis** infections of sheep.
- Munn, E.A.; Greenwood, C.A. y Coadwell, W.J. (1987). Vaccination of young lambs by means of a protein fraction extracted from adult **Haemonchus contortus**. Parasitology, 94: 385-397.
- Munn, E.A.; Smith, T.S.; Graham, M.; Greenwood, C.A.; Tavernor, A.S. y Coetzee, G. (1993a). Vaccination of Merino lambs against haemonchosis with membrane-associated proteins from the adult parasite. Parasitology, 106: 63-66.
- Munn, E.A.; Smith, T.S.; Graham, M.; Tavernor, A.S. y Greenwood, C.A. (1993b). The potential value of integral membrane proteins in the vaccination of lambs against **Haemonchus contortus**. International Journal for Parasitology, 23 (2): 261-269.
- Murray, J. y Smith, W.D. (1994). Ingestion of host immunoglobulin by three non-blood-feeding nematode parasites of ruminants. Research in Veterinary Science, 57: 387-389.
- Neilson, J.T.M. (1969). Gel filtration and disc electrophoresis of somatic extract and excretions and secretions of **Haemonchus contortus** larvae. Experimental Parasitology, 25: 131-141.
- Neilson, J.T.M. y van de Walle, M.J. (1987). Partial protection of lambs against **Haemonchus contortus** by vaccination with a fractionated preparation of the parasite. Veterinary Parasitology, 23: 211-221.
- Newton, S.E.; Morrish, L.E.; Martin, P.J.; Montague, P.E. y Rolph, T.P. (1995). Protection against multiply drug-resistant and geographically distant strains of **Haemonchus contortus** by vaccination with H11, a gut membrane-derived protective antigen. International Journal for Parasitology, 25 (4): 511-521.
- Outteridge, P.M.; Windon, R.G. y Dineen, J.K. (1985). An association between a lymphocyte antigen in sheep and the response to vaccination against the parasite **Trichostrongylus colubriformis**. International Journal for Parasitology, 15 (2): 121-127.
- Outteridge, P.M.; Windon, R.G.; Dineen, J.K. y Smith, E.F. (1986). The relationship between ovine lymphocyte antigens and faecal egg count of sheep selected for responsiveness to vaccination against **Trichostrongylus colubriformis**. International Journal for Parasitology, 16 (4): 369-374.
- Ozerol, N.H. y Silverman, P.H. (1969). Partial characterization of **Haemonchus contortus** exsheathing fluid. The Journal of Parasitology, 55 (1): 79-87.
- Ozerol, N.H. y Silverman, P.H. (1970). Further characterization of active metabolites from histotropic larvae of **Haemonchus contortus** cultured in vitro. The Journal of Parasitology, 56 (6): 1199-1205.
- Pellerin, J.L.; Lefevre, S. y Bodin, G. (1990). L'immunité humorale au cours de la gestation chez la brebis et sa transmission à l'agneau. Revue de Médecin Vétérinaire, 141 (6): 469-478.
- Pernthaner, A.; Stankiewicz, M.; Bisset, S.A.; Jonas, W.E.; Cabaj, W. y Pulford, H.D. (1995a). The immune responsiveness of Romney sheep selected for resistance or susceptibility to gastrointestinal

nematodes: lymphocyte blastogenic activity, eosinophilia and total white blood cell counts. International Journal for Parasitology, 25 (4): 523-529.

Pernthaner, A.; Stankiewicz, M.; Cabaj, W. y Jonas, W. (1995b). Immune responsiveness of Romney shepp selected for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes: field studies. Veterinary Immunology and Immunopathology, 48: 97-103.

Péry, P.; Petit, A.; Poulain, J. y Luffau, G. (1974). Phosphorylcholine-bearing components in homogenates of nematodes. European Journal of Immunology, 4: 637-639.

Petit, A.; Péry, P. y Luffau, G. (1981). Circulating antigens in ovine haemonchosis. Annales de Recherches Vétérinaires, 12 (1): 1-9.

Petronijevic, T.; Rogers, W.P. y Sommerville, R.I. (1985). Carbonic acid as the host signal for the development of parasitic stages of nematodes. International Journal for Parasitology, 15 (6): 661-667.

Piper, L.R. (1987). Genetic variation in resistance to internal parasites. In: McGuirk (Edit.). Merino improvement program in Australia. Australian Wool Corporation, Sydney, pp. 351-363.

Presson, B.L.; Gray, G.D. y Burgess, S.K. (1988). The effect of immunosuppression with dexamethasone on **Haemonchus contortus** infections in genetically resistant Merino sheep. Parasite Immunology, 10: 675-680.

Preston, J.M. y Allonby, E.W. (1979a). The influence of breed on the susceptibility of sheep to **Haemonchus contortus** infection in Kenya. Research in Veterinary Science, 26: 134-139.

Preston, J.M. y Allonby, E.W. (1979b). The influence of haemoglobin phenotype on the susceptibility of sheep to **Haemonchus contortus** infection in Kenya. Research in Veterinary Science, 26: 140-144.

Pritchard, D.I. (1993). Does the duration of antigen retention in draining lymphoid tissue following GI nematode infection determine the "responder phenotype" of the host?. International Journal for Parasitology, 23 (1): 11-12.

Radhakrishnan, C.V.; Bradley, R.E. y Loggins, P.E. (1972). Host responses of worm-free Florida Native and Rambouillet lambs experimentally infected with **Haemonchus contortus**. American Journal of Veterinary Research, 33 (4): 817-823.

Rahman, W.A. y Collins, G.H. (1990a). The establishment and development of **H. contortus** in goats. Veterinary Parasitology, 35: 189-193.

Rahman, W. y Collins, G.H. (1990b). Changes in liveweight gain, blood constituents and worm egg output in goats artificially infected with a sheep-derived strain of **Haemonchus contortus**. British Veterinary Journal, 146: 543-550.

Reinecke, R.K.; Snyman, H.M. y Seaman, H. (1979). Studies on **Haemonchus contortus**. II. The effect of abomasal nematodes on subsequent challenge with **H. contortus**. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 46: 199-205.

Reynolds, G.E. y Griffin, J.F.T. (1990). Humoral immunity in the ewe 2. The effect of pregnancy on the primary and secondary antibody response to protein antigen. Veterinary Immunology and Immunopathology, 25: 155-166.

Rhoads, M.L. y Fetterer, R.H. (1990). Biochemical and immunochemical characterization of ¹²⁵I-labeled cuticle components of **Haemonchus contortus**. Molecular and Biochemical Parasitology, 42: 155-164.

Rhoads, M.L. y Fetterer, R.H. (1994). Purification and characterization of surface-associated proteins from adult **Haemonchus contortus**. The Journal of Parasitology, 80 (5): 756-763.

- Roberts, J.A. y Adams, D.B. (1990). The effect of level of nutrition on the development of resistance to **Haemonchus contortus** in sheep. Australian Veterinary Journal, 67: 89-91.
- Robert, J.L y Swan, R.A. (1981). Quantitative studies of ovine haemonchosis. 1. Relationship between faecal egg counts and total worm counts. Veterinary Parasitology, 8: 165-171.
- Roberts, J.L. y Swan, R.A. (1982a). Quantitative studies of ovine haemonchosis. 2. Relationship between total worm counts of **Haemonchus contortus**, haemoglobin values and bodyweight. Veterinary Parasitology, 9: 201-209.
- Robert, J.L y Swan, R.A. (1982b). Quantitative studies of ovine haemonchosis. 3. The interpretation and diagnostic significance of the changes in serial egg counts of **Haemonchus contortus** in a sheep flock. Veterinary Parasitology, 9: 211-216.
- Rogers, W.P. (1982). Enzymes in the exsheathing fluid of nematodes and their biological significance. International Journal for Parasitology, 12 (6): 495-502.
- Roos, M.H. y Grant, W.N. (1993). Species-specific PCR for the parasitic nematodes **Haemonchus contortus** and **Trichostrongylus colubriformis**. International Journal for Parasitology, 23 (3): 419-421.
- Ross, J.G.; Duncan, J.L. y Halliday, W.G. (1978). Investigation of **Haemonchus contortus** infections in sheep. Comparison of irradiated larvae and transfer factor treatment. Research in Veterinary Science, 27: 258-259.
- Ross, J.G. y Halliday, W.G. (1979a). Investigations of "transfer factor" activity in the transfer of immunity to **Trichostrongylus axei** infections in sheep. Research in Veterinary Science, 26: 41-46.
- Ross, J.G. y Halliday, W.G. (1979b). Investigations of "transfer factor" activity in immunity to **Ostertagia circumcincta** and **Trichostrongylus colubriformis** infections in sheep. International Journal for Parasitology, 9: 281-284.
- Rothwell, T.L.W.; Windon, R.G.; Horsburg, B.A. y Anderson, B.H. (1993). Relationship between eosinophilia and responsiveness to infection with **Trichostrongylus colubriformis** in sheep. International Journal for Parasitology, 23 (2): 203-211.
- Rothwell, T.L.W.; Horsburg, B.A.; France, M.P. y Windon, R.G. (1994). Basophil leucocytes in responses to parasitic infection and some other stimuli in sheep. Research in Veterinary Science, 56: 319-324.
- Rowe, J.B.; Nolan, J.V.; de Chaneet, G. y Teleni, E. (1988). The effect of haemonchosis and blood loss into the abomasum on defecation in sheep. British Journal of Nutrition, 59: 125-139.
- Salman, S.K. y Duncan, J.L. (1985). Studies on the abomasal pathology of immunized and non-immunized sheep infected with **Haemonchus contortus**. Journal of Helminthology, 59: 351-359.
- Sánchez Belda, A. y Sánchez Trujillano, M.C. (1986). Razas ovinas españolas. M.A.P.A., Madrid.
- Savin, K.W.; Dopheide, T.A.A.; Frenkel, M.J.; Wagland, B.M.; Grant, W.N. y Ward, C.W. (1990). Characterization, cloning and host-protective activity of a 30-kilodalton glycoprotein secreted by the parasitic stages of **Trichostrongylus colubriformis**. Molecular and Biochemical Parasitology, 41: 167-176.
- Schallig, H.D.F.H.; van Leeuwen, M.A.W.; Bernadina, W.E. y Hendriks, W.M.L. (1994a). Serum antibody responses of Texel sheep experimentally infected with **Haemonchus contortus**. Research in Veterinary Science, 57: 63-68.
- Schallig, H.D.F.H.; van Leeuwen, M.A.W. y Hendriks, W.M.L. (1994b). Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult **Haemonchus contortus**. Parasitology, 108: 351-357.

- Schallig, H.D.F.H.; van Leeuwen, M.A.W. y Hendriks, W.M.L. (1995a). Isotype-specific serum antibody responses of sheep to **Haemonchus contortus** antigens. Veterinary Parasitology, 56: 149-162.
- Schallig, D.D.F.H.; Hornok, S. y Cornelissen, J.B.W.J. (1995). Comparison of two enzyme immunoassays for the detection of **Haemonchus contortus** infections in sheep. Veterinary Parasitology, 57: 329-338.
- Schwaiger, F.W.; Gostonski, D.; Stear, M.J.; Duncan, J.L.; McKellar, Q.A.; Epplen, J.T. y Buitkamp, J. (1995). An ovine major histocompatibility complex DRB1 allele is associated with low faecal egg counts following natural, predominantly **Ostertagia circumcincta** infection. International Journal for Parasitology, 25 (7): 815-822.
- Seaton, D.S.; Jackson, F.; Smith, W.D. y Angus, K.W. (1989). Development of immunity to incoming radiolabelled larvae in lambs continuously infected with **Trichostrongylus vitrinus**. Research in Veterinary Science, 46: 22-26.
- Shamansky, L.M.; Pratt, D.; Boisvenue, R.J. y Cox, G.N. (1989). Cuticle collagen genes of **Haemonchus contortus** and **Caenorhabditis elegans** are highly conserved. Molecular and Biochemical Parasitology, 37: 73-86.
- Sharp, P.J.; Smith, D.R.J.; Bach, W.; Wagland, B.M. y Cobon, G.S. (1991). Purified glutathione S-transferases from parasites as candidate protective antigens. International Journal for Parasitology, 21 (7): 839-846.
- Simons, P.C. y Vander Jagt (1977). Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione-affinity chromatography. Analytical Biochemistry, 82: 334-341.
- SkwarXo-Sonta, K. (1992). Prolactin as an immunoregulatory hormone in mammals and birds. Immunology Letters, 33: 105-122.
- Smith, T.S.; Munn, E.A.; Graham, M.; Tavernor, A.S. y Greenwood, C.A. (1993). Purification and evaluation of the integral membrane protein H11 as a protective antigen against **Haemonchus contortus**. International Journal for Parasitology, 23 (2): 271-280.
- Smith, W.D. (1977a). Serum and mucus antibodies in sheep immunised with larval antigens of **Haemonchus contortus**. Research in Veterinary Science, 22: 128-129.
- Smith, W.D. (1977b). Anti-larval antibodies in the serum and abomasal mucus of sheep hyperinfected with **Haemonchus contortus**. Research in Veterinary Science, 22: 334-338.
- Smith, W.D. y Angus, K.W. (1980). **Haemonchus contortus**: attempts to immunise lambs with irradiated larvae. Research in Veterinary Science, 29: 43-50.
- Smith, W.D. y Christie, M.G. (1978). **Haemonchus contortus**: Local and serum antibodies in sheep immunised with irradiated larvae. International Journal for Parasitology, 8: 219-223.
- Smith, W.D.; Jackson, F.; Jackson, E.; Williams, J.; Willadsen, S.M. y Fehilly, C.B. (1984). Resistance to **Haemonchus contortus** transferred between genetically histocompatible sheep by immune lymphocytes. Research in Veterinary Science, 37: 199-204.
- Smith, W.D.; Jackson, F.; Jackson, E.; Williams, J.; Willadsen, S.M. y Fehilly, C.B. (1986). Transfer of immunity to **Ostertagia circumcincta** and IgA memory between identical sheep by lymphocytes collected from gastric lymph. Research in Veterinary Science, 41: 300-306.
- Smith, W.D.; Jackson, F.; Graham, R.; Jackson, E. y Williams, J. (1987). Mucosal IgA production and lymph cell traffic following prolonged low level of infections of **Ostertagia circumcincta** in sheep. Research in Veterinary Science, 43: 320-326.
- Smith, W.D.; Smith, S.K. y Murray, J.M. (1994). Protection studies with integral membrane fractions of **Haemonchus contortus**. Parasite Immunology, 16: 231-241.

- Sokal, R.R. y Rohlf, J. (1986). Introducción a la Bioestadística. (ed. española) Ed. Reverte, S.A., Barcelona.
- Soulsby, E.J.L. (1987). Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos (7ª edición). Nueva editorial Interamericana, Mexico.
- Stréter, T. Kassai, T. y Takács, E. (1994). The heritability and specificity of responsiveness to infection with **Haemonchus contortus** in sheep. International Journal for Parasitology, 24 (6): 871-876.
- Stankiewicz, M.; Cabaj, W.; Jonas, W.E.; Moore, L.G. y Chie, W.Ng. (1994). Oxfendazole treatment of non-parasitized lambs and its effect on the immune system. Veterinary Research Communications, 18: 7-18.
- Stankiewicz, M.; Cabaj, W.; Jonas, W.E.; Moore, L.G.; Millar, K. y Chie, W.Ng. (1995). Influence of ivermectin on cellular and humoral immune responses of lambs. Veterinary Immunology and Immunopathology, 44: 347-358.
- Stear, M.J. y Murray, M. (1994). Genetic resistance to parasitic disease: particularly of resistance in ruminants to gastrointestinal nematodes. Veterinary Parasitology, 54: 161-176.
- Stear, M.J.; Bairden, K.; Duncan, J.L. y Murray, M. (1995). A comparison of the responses to repeated experimental infections with **Haemonchus contortus** among Scottish Blackface lambs. Veterinary Parasitology, 60: 69-81.
- Steel, J.W.; Jones, W.O. y Wagland, B.M. (1990). The response of immune sheep to challenge with **Trichostrongylus colubriformis**: enteric plasma loss and secretion of biogenic amines. International Journal for Parasitology, 20 (8): 1067-1073.
- Stevenson, L.M.; Huntley, J.F. Smith, W.D. y Jones, D.G. (1994). Local eosinophil- and mast cell-related responses in abomasal nematode infections of lambs. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 8: 167-174.
- Takács, C.; Schallig, H.D.F.H.; van Leeuwen, M.A.W. y Hendrikx, W.M.L. (1995). Immune responses of sheep to microdissected parts of **Haemonchus contortus**. International Journal for Parasitology, 25: 857-860.
- Tarazona Vilas, J.M. (1974). Aportaciones al estudio de las gastroenteritis producidas por nematodos parásitos en los ovinos españoles. Anales INIA, Serie: Higiene y Sanidad Animal, 1: 63-85.
- Tavernor, A.S.; Smith, T.S.; Langford, C.F.; Munn, E.A. y Graham, M. (1992a). Vaccination of young Dorset lambs against haemonchosis. Parasite Immunology, 14: 645-655.
- Tavernor, A.S.; Smith, T.S.; Langford, C.F.; Graham, M. y Munn, E.A (1992b). Immune response of Clun Forest sheep to vaccination with membrane glycoproteins from **Haemonchus contortus**. Parasite Immunology, 14: 671-675.
- Taylor, D.M. y Thomas, R.J. (1986). The development of immunity to **Nematodirus battus** in lambs. International Journal for Parasitology, 16(1): 43-46.
- Thomas, R.J. y Ali, D.A. (1983). The effect of **Haemonchus contortus** infection on the pregnant and lactating ewe. International Journal for Parasitology, 13 (4): 393-398.
- Thomas, R.J.; Waller, P.J. y Cottrill, B.R. (1975). The effect of ageing on the antigenicity of **Haemonchus contortus** larvae. Research in Veterinary Science, 19: 113-114.
- Torgerson, P.R. y Lloyd, S. (1992). Lymphocyte reactivity to antigens of **Haemonchus contortus** in antigen-inoculated and **Haemonchus**-naive lambs. American Journal of Veterinary Research, 53 (9): 1699-1704.
- Torgerson, P.R. y Lloyd, S. (1993a). The B cell dependence of **Haemonchus contortus** antigen-induced lymphocyte proliferation. International Journal for Parasitology, 23 (7): 925-930.

Torgerson, P.R. y Lloyd, S. (1993b). The same fractions of **Haemonchus contortus** soluble antigen induce lymphocyte responses in naive lambs and immune sheep. Research in Veterinary Science, 54: 244-246.

Turnbull, I.F.; Bowles, V.M.; Wiltshire, C.J.; Brandon, M.R. y Meeusen, E.N.T. (1992). Systemic immunization of sheep with surface antigens from **Haemonchus contortus** larvae. International Journal for Parasitology, 22 (4): 537-540.

Uriarte, J. y Valderrábano (1989). An epidemiological study of parasitic gastroenteritis in sheep under an intensive grazing system. Veterinary Parasitology, 31: 71-81.

Uriarte, J. y Valderrábano, J. (1990). Grazing management strategies for the control of parasitic diseases in intensive sheep production system. Veterinary Parasitology, 37: 243-255.

Urquhart, G.M.; Jarret, W.F.H.; Jennings, F.W.; McIntyre, W.I.M. y Mulligan, W. (1966). Immunity to **Haemonchus contortus** infection: relationship between age and successful vaccination with irradiated larvae. American Journal of Veterinary Research, 27 (121): 1645-1648.

Vray, B.; de Vos, L.; Josens, G.; Pecheur, M. y Losson, B. (1988). Etude en microscopie électronique à balayage de ver mirliton **Haemonchus contortus** (Rudolphi, 1803). Annales de Médecine Vétérinaire, 132: 13-24.

Wakelin, D. (1992). Genetic variation in resistance to parasitic infection: experimental approaches and practical applications. Research in Veterinary Science, 53: 139-147.

Waller, P.J. y Faedo, M. (1993). The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: screening studies. Veterinary Parasitology, 49: 285-297.

Waller, P.J.; Dash, K.M.; Barger, I.A.; Le Jambre, L.F. y Plant, J. (1995). Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep: learning from the Australian experience. The Veterinary Record, 136: 411-413.

Wales, A. y Kusel, J.R. (1992). Biochemistry of irradiated parasite vaccines: suggested models for their mode of action. Parasitology Today, 8 (11): 358-363.

Watson, D.L.; Colditz, I.G.; Andrew, M.; Gill, H.S. y Altmann, K.G. (1994). Age-dependent immune response in Merino sheep. Research in Veterinary Science, 57: 152-158.

Wedrichowicz, H.; Abbott, F.M y Holmes, P.H. (1984). Use of coproantibody measurement to assess the influence of diet on local immune responses of sheep vaccinated against **Haemonchus contortus**. Research in Veterinary Science, 36: 240-246.

Wedrychowicz, H.; Holmes, P.H.; Bairden, K. y Tait, A. (1994). Surface and excretory/secretory antigens of fourth-stage larvae and adult **Ostertagia circumcincta**. Veterinary Parasitology, 53: 117-132.

Whitlock, J.H. (1955). A study of the inheritance of resistance to trichostrongylidosis in sheep. The Cornell Veterinary, 45: 422-439.

Windle, R.G. (1990). Selective breeding for the control of nematodiasis in sheep. Revue Scientifique et Technique. Office International des Epizooties, 9 (2): 555-576.

Windle, R.G. (1991). Genetic control of host responses involved in resistance to gastrointestinal nematodes of sheep. In: Owen, J.B. y Axford, R.F.E. (Edits.). Breeding for disease resistance in farm animals, C.A.B. international, U.K., pp. 162-186.

Windle, R.G.; Dineen, J.K.; Gregg, P.; Griffiths, D.A. y Donald, A.D. (1984). The role of thresholds in the response of lambs to vaccination with irradiated **Trichostrongylus colubriformis** larvae. International Journal for Parasitology, 14 (4): 423-428.

Woolaston, R.R. (1990). Genetic improvement of resistance to internal parasites in sheep. Wool Technology and sheep breeding. March/April: 1-6.

Woolaston, R.R. (1993). Factors affecting the prevalence and severity of footrot in a Merino flock selected for resistance to **Haemonchus contortus**. Australian Veterinary Journal. 70: 365-369.

Woolaston, R.R.; Elwin, R.L. y Barger, I.A. (1992). No adaptation of *Haemonchus contortus* to genetically resistant sheep. International Journal for Parasitology. 22 (3): 377-380.

Zajac, A.M.; Herd, R.P. y McClure, K.E. (1988). Trichostrongylid parasite populations in pregnant or lactating and unmated Florida native and Dorset/Rambouillet ewes. International Journal for Parasitology. 18 (7): 981-985.

Zajac, A.M.; Krakowka, S.; Herd, R.P. y McClure, K.E. (1990). Experimental **Haemonchus contortus** infection in three breeds of sheep. Veterinary Parasitology. 36: 221-235.